

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA LETÍCIA FERREIRA

METODOLOGIAS ANALÍTICAS COM EMPREGO DE NANOTECNOLOGIA PARA
DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE E SEUS DERIVADOS: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA

CURITIBA

2021

CAMILA LETÍCIA FERREIRA

METODOLOGIAS ANALÍTICAS COM EMPREGO DE NANOTECNOLOGIA PARA
DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE E SEUS DERIVADOS: UMA
REVISÃO SISTEMÁTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva
Orientadora: Profa. Dra. Helena Hiemisch Lobo Borba

CURITIBA

2021

Ferreira, Camila Letícia

Metodologias analíticas com emprego de nanotecnologia para detecção de antibióticos em leite e seus derivados [recurso eletrônico]: uma revisão sistemática / Camila Letícia Ferreira – Curitiba, 2021.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2021.

Orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Helena Hiemisch Lobo Borba

1. Antibióticos. 2. Resíduos. 3. Leite bovino. 4. Nanotecnologia. 5. Revisão sistemática. I. Silva, Luciano Paulino da. II. Borba, Helena Hiemisch Lobo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.329

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILA LETÍCIA FERREIRA** intitulada: **Metodologias analíticas com emprego de nanotecnologia para detecção de antibióticos em leite e seus derivados: uma revisão sistemática**, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO PAULINO DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

04/10/2021 15:46:58.0

LUCIANO PAULINO DA SILVA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

04/10/2021 15:40:59.0

LETÍCIA PAULA LEONART GARMATTER

Avaliador Externo (Pós-DOC/UFPR)

Assinatura Eletrônica

04/10/2021 17:00:04.0

GABRIELLA MAGARELLI

Avaliador Externo (EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Maria Neusa, por ser a maior incentivadora da minha busca pelo conhecimento. À minha vó, Maria de Lourdes, que me ensinou com toda sua história a ser forte, confiante e agradecida pelas coisas simples da vida. A todos os familiares que me incentivaram e me ajudaram a crescer.

Ao meu melhor amigo e parceiro de vida, Matheus Yair, que acompanhou de perto o meu esforço, por todo seu amor e paciência. Aos meus amigos do grupo Paulinha, com os quais eu tenho muito orgulho de compartilhar a profissão, pelas chamadas de vídeo cheias de desabafo. Aos meus amigos do LNANO, por estarem sempre dispostos a ajudar e por compartilharem comigo bons momentos dentro e fora do laboratório. A minha amiga Gabriela Valetim, por todo carinho e apoio ao longo do mestrado. E todos os amigos que estiveram comigo nessa jornada, fazendo a minha vida mais leve e feliz.

Ao meu orientador, Luciano Paulino, que colaborou imensamente durante esses anos para o meu desenvolvimento profissional. À minha coorientadora, Helena Hiemish, por ter aceitado o desafio de contribuir com esse estudo em um momento tão delicado, por todo auxílio e paciência. A professora e grande amiga, Tânia Bonfim, que fez da minha experiência na Universidade Federal do Paraná a mais incrível possível. Ao André Felipe, por ter me auxiliado na revisão sistemática como segundo revisor. E a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Por fim, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná pela estrutura e apoio e à CAPES pela concessão da bolsa que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Antibióticos têm sido essenciais para a humanidade desde a sua descoberta. No entanto, diversos problemas têm levado à chamada crise dos antibióticos, em especial o surgimento de resistência bacteriana. Para controlar a resistência, o uso racional de compostos antibacterianos na medicina humana e na medicina veterinária é indispensável. As consequências do uso de antibióticos na pecuária vão além do desenvolvimento de resistência. Os alimentos de origem animal, em especial o leite, podem conter resíduos de antibióticos e colocar em risco a saúde dos consumidores, por isso, esses fármacos devem estar sempre em concentrações abaixo dos limites estabelecidos e considerados seguros pelas agências reguladoras. Para que esses limites sejam cumpridos, metodologias analíticas sensíveis e com alta seletividade são necessárias para detecção dessas moléculas e seus metabólitos derivados. Nos últimos anos, o avanço da nanotecnologia trouxe diversas inovações no campo analítico instrumental e, apesar de não serem citados ainda nos regulamentos técnicos e legislativos, muitos estudos têm desenvolvido novas metodologias com aplicações nanotecnológicas para detecção de antibióticos no leite e seus derivados. Para reunir, caracterizar e explorar as evidências atuais sobre esses métodos, o presente estudo consistiu em uma revisão sistemática sobre o tema. Para isso, foram pesquisados em bases de dados eletrônicas estudos contendo descritores relativos a “antibióticos”, “métodos analíticos” e “leite e derivados” com as suas respectivas variações. As bases de dados utilizadas foram Pubmed, Web of Science e Scopus. As etapas de triagem, elegibilidade e extração de dados foram realizadas por dois revisores de maneira independente. Foram coletados os dados gerais dos estudos, como data de publicação, técnica analítica e aplicação nanotecnológica, bem como os dados de validação, levando em consideração os guias de validação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e guias de agências internacionais como do *Food and Drug Administration* (FDA). Na etapa de compilação e síntese dos dados, foram elaborados gráficos e tabelas para ilustrar e agrupar as características dos estudos e os resultados obtidos foram também apresentados de forma descritiva. Além disso, cada um dos parâmetros de validação foi discutido quanto à concordância com os guias de validação empregados atualmente. Um total de 5.174 estudos foram encontrados, dos quais 38 estudos que atenderam todos os critérios de inclusão foram selecionados para a extração de dados. Os resultados apontaram que o antibiótico mais avaliado pelas metodologias desenvolvidas foi o cloranfenicol, seguido da sulfadiazina, tetraciclina e enrofloxacin. A técnica analítica mais utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada ao uso da nanotecnologia, sendo que a aplicação nanotecnológica mais frequente foi para etapa de preparação da amostra com a extração em fase sólida (EFS). Os dados relacionados com a validação estiveram na maioria dos casos dentro dos limites impostos pelos guias, mas os critérios mais conceituais se mostraram pouco homogêneos entre os estudos, dificultando comparações diretas. Com isso, esse estudo visa nortear os pesquisadores da área de desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção de antibióticos, mas também os órgãos responsáveis pela regulamentação, monitoramento e fiscalização da presença de resíduos de antibióticos no leite e derivados.

Palavras-chave: resíduos de antibióticos; leite bovino; metodologias analíticas; nanotecnologia; validação de métodos; revisão sistemática.

ABSTRACT

Antibiotics have been essential to mankind since their discovery. However, the last decades have evolved into the so-called antibiotic crisis, in particular with the emergence of bacterial resistance. The rational use of antibacterials, both in human and in veterinary medicine, is essential to control resistance spread. The consequences of the use of antibiotics in farm animals go beyond the development of resistance. Foods of animal origin, milk in particular, can carry antibiotic residues that can endanger the health of consumers, so these drugs must always be within the limits determined and considered safe. For these limits to be met, analytical methodologies with high selectivity are required for these molecules. In recent years, the advance of nanotechnology has brought innovations in the instrumental analytical field and, despite not being mentioned in technical and legislative bodies, many studies have developed new methodologies with nanotechnology applications for detecting antibiotics in milk and dairy products. To gather, characterize and summarize evidence on these methods, this scientific study is a systematic review on this topic. For this, bibliographical references were searched in electronic databases with the descriptors of “antibiotics”, “analytical methods” and “milk and dairy products” along with their variations. The databases used were Pubmed, Web of Science and Scopus. The screening, eligibility and data extraction steps were performed by two reviewers independently. General data were collected, such as publication data, analytical technique and nanotechnology application, as well as validation data taking into account the validation guide of the Ministry of Agriculture and international guides such as the Food and Drug Administration (FDA) guidance. In the data synthesis stage, graphs and tables were created to illustrate and group the characteristics of the studies and the results were provided descriptively. In addition, each of the validation parameters was discussed in terms of agreement with the validation guidelines. A total of 5,174 studies were found, of which 38 studies that met all inclusion criteria were selected for data extraction. The results showed that the antibiotics most evaluated by the developed methodologies were chloramphenicol, followed by sulfadiazine, tetracycline and enrofloxacin. The most used analytical technique was high performance liquid chromatography (HPLC) associated with the use of nanotechnology, and the most frequent application of nanotechnology was for the sample preparation step with solid-phase extraction (EFS). The data relating to validation were, in most cases, within the limits imposed by the guides, but the more conceptual criteria were not very homogeneous among the studies. Thus, this study aims to guide researchers in the area of development of analytical methodologies for the detection of antibiotics, but also the bodies responsible for the regulation and monitoring of antibiotic residues in milk and dairy products.

Keywords: antibiotic residues; bovine milk; analytical methodologies; nanotechnology; method validation; systematic review.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das etapas para condução da revisão sistemática	43
Figura 2 - Fluxograma das etapas do processo de seleção dos artigos	46
Figura 3 - Distribuição dos artigos incluídos por ano de publicação.....	49
Figura 4 - Matrizes utilizadas para a detecção de antibióticos por meio dos métodos analíticos desenvolvidos	50
Figura 5 - Frequência de antibióticos como analitos nos artigos incluídos.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados gerais dos métodos analíticos de cada estudo incluído.....	58
Tabela 2 - Limites de detecção, limites de quantificação e faixa de linearidade dos antibióticos	66
Tabela 3 - Valores de precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e recuperação dos estudos eleitos	72
Tabela 4 - Critérios de aceitação da precisão	73
Tabela 5 - Faixas de aceitação para os valores de recuperação acima e abaixo de 100%	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP Ampicilina

AMX Amoxicilina

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AgNP Nanopartícula de prata

AS Sulfacetamida

ATC Anidrotetraciclina

AuNF Nanoestruturas de ouro funcionalizadas em forma de flor

AuNP Nanopartícula de ouro

CAP Cloranfenicol

CB *Carbon Black*

CFP Cefalosporinas

CIP Ciprofloxacina

CL Cromatografia Líquida

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CLX Cloxaciclina

COVID *Corona Virus Disease*

CTC Clortetraciclina

DABCO 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane

DAD Detector de arranjo de diodos

DAN Danofloxacina

DC Doxiciclina

DIF Difloxacina

DMC Domeclociclina

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DSPE Extração em fase sólida dispersiva

D-μ-SPE Microextração em fase sólida dispersiva

EC Ensaio interlaboratorial coletivo

EC-MSPE Extração em fase sólida magnética controlada eletroquimicamente

EFS Extração em Fase Sólida

EIS Eletrodo íon seletivo

ELISA *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELL Extração líquido-líquido

ELT Espectroscopia de lente térmica

ENR Enrofloxacin

ERY Eritromicina

ESVAC *European Surveillance Agency on Veterinary Antimicrobial Consumption*

ETC 4-epitetraciclina

FAO *Food and Agriculture Organization*

FDA *Food and Drug Administration*

FF Florfenicol

FIA Imunoensaio de fluorescência

FLE Fleroxacin

GAT Gatifloxacin

IC-FLD Cromatografia de íons acoplada a detector de fluorescência

I_{max} Incerteza Máxima Aceitável

IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry*

JB *Joanna Briggs Institute*

KAN Canamicina

LACEN Laboratório Central de Saúde Pública

LD Limite de Detecção

LMDR Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LMR Limite Máximo de Resíduo

LOM Lomefloxacin

LQ Limite de Quantificação

LS *Light scattering*

LVX Levofloxacin

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MERCOSUL Mercado Comum do Sul

MEDLINE Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica

MIP Polímero Molecularmente Impresso

MIP/Zr-LMOF Polímero molecularmente impresso revestido em estrutura metalorgânica de zircônio luminescente

MRC Material de Referência Certificado

MS Ministério da Saúde

MS/MS Espectrometria de Massas em Tandem

MSPE Extração magnética em fase sólida

M-μ-SPE Microextração em fase sólida magnética

Nano-LC Nanocromatografia líquida

NCPM Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas

NECQ Nanobalança eletroquímica de cristal de quartzo

NOR Norfloxacin

OFL Ofloxacin

OMS Organização Mundial da Saúde

OTC Oxitetraciclina

OXC Oxacilina

PAMVet Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PEF Pefloxacin

PFSPE Extração de fase sólida de nanofibra empacotada

PNG Penicilina G

PtNP Nanopartícula de platina

QCM Microbalança de cristal de quartzo

Q-TOF Quadrupolo e Tempo de Voo

RDC Resolução da Diretoria Colegiada

rGO Óxido de Grafeno reduzido

RNA Ácido Ribonucleico

RSD Desvio Padrão Relativo

SAR Sarafloxacin

SBZ Sulfabenzamida

SCP Sulfaclopiridazina

SDMX Sulfadimetoxina

SDX Sulfadoxina

SDZ Sulfadiazina

SELEX Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial

SIX Sulfisoxazol

SGN Sulfaguanidina

SMD Sulfisomidina

SME Sulfametrol

SMM Sulfamonometoxina

SMP Sulfametoxipiridazina

SMR Sulfamerazina

SMT Sulfametizol

SMX Sulfametoxazol

SMZ Sulfametazina

SNL Sulfanilamida

SP Sulfafenazol

SPD Sulfapiridina

SQX Sulfaquinoxalina

SRT Streptomicina

ssDNA Ácido Desoxirribonucleico fita simples

STZ Sulfatiazol

SWV Voltametria de onda quadrada

TAP Tianfenicol

TC Tetraciclina

TOB Tobracina

UE União Europeia

UV/Vis Ultravioleta/Visível

VIM Vocabulário Internacional de Metrologia

VRE Enterococos Resistentes à Vancomicina

μ-QuEChERS Microextração em fase sólida "rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura"

μ-SPE Microextração em fase sólida

μg Micrograma

kg Quilograma

R² Coeficiente de determinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2. 1 OBJETIVO GERAL	20
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 ANTIBIÓTICOS	21
3.1.1 Uso de antibióticos na medicina veterinária.....	22
3.1.2 Resistência bacteriana.....	24
3.1.3 Alimentos de origem animal e resíduos de antibióticos	26
3.1.4 Leite e derivados	27
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	28
3.2.1 Métodos de triagem	29
3.2.2 Métodos confirmatórios.....	31
3.2.3 Nanotecnologia aplicada a metodologias analíticas	32
3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	34
3.3.1 Seletividade	35
3.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação	36
3.3.3 Linearidade	36
3.3.4 Precisão.....	37
3.3.5 Recuperação/Veracidade	38
3.3.6 Efeito matriz.....	38
3.3.7 Robustez.....	39
3.4 LEGISLAÇÃO	39
3.5 REVISÃO SISTEMÁTICA.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	43
4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	44
4.3 LOCALIZAÇÃO DOS ESTUDOS.....	44
4.4 SELEÇÃO DOS ESTUDOS.....	44
4.5 EXTRAÇÃO DOS DADOS.....	45
4.6 SÍNTESE DOS RESULTADOS	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS.....	46
5.2 ESTUDOS EXCLUÍDOS.....	47
5.3 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	47
5.3.1 Local de origem	47
5.3.2 Ano de publicação	48
5.3.3 Matrizes analisadas	49
5.3.4 Analitos	50
5.3.5 Técnicas analíticas e aplicações nanotecnológicas.....	54
5.4 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS	62
5.4.1 Seletividade	62
5.4.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	64
5.4.3 Linearidade	69
5.4.4 Precisão	70
5.4.5 Recuperação	73
5.4.6 Efeito matriz.....	74
5.4.7 Robustez.....	75
5.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	76
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICE 1 – ESTRATÉGIA DE BUSCA APLICADA NAS BASES DE DADOS....	93

APÊNDICE 2 – ESTUDOS INCLUÍDOS PARA A REVISÃO SISTEMÁTICA.....	96
APÊNDICE 3 – TABELAS PARA EXTRAÇÃO DE DADOS	101

1 INTRODUÇÃO

Antibióticos são originalmente metabólitos produzidos por organismos vivos, como fungos e bactérias, para inibir o crescimento de outros microrganismos como forma de defesa e sobrevivência (LANCINI; LORENZETTI, 1993). A descoberta dessas substâncias, e o posterior desenvolvimento de estratégias sintéticas e semissintéticas, para o tratamento de infecções bacterianas em humanos e animais de criação pode ser considerada a maior inovação médica do século XX (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

No entanto, nas últimas décadas diversos problemas têm levado a uma crise dos antibióticos. O surgimento de resistência bacteriana é sem dúvida um dos mais impactantes (FERRI; RANUCCI; ROMAGNOLI; GIACCONE, 2017). O uso indevido de antibióticos contribui para a expressão de genes de resistência nas células bacterianas, por esse mecanismo o organismo deixa de ser sensibilizado pelo antibiótico e consequentemente o antibacteriano perde seu potencial terapêutico (RATHER; KIM; BAJPAI; PARK, 2017). É estimado que os problemas envolvendo resistência bacteriana levem a cerca de 10 milhões de mortes até o ano 2050, e despesas próximas a 100 trilhões de dólares (SANGANYADO; GWENZI, 2019).

Quanto ao uso veterinário, existem três propósitos básicos para a aplicação de antibióticos em animais na pecuária segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). São estes: o uso terapêutico para aqueles animais que já possuem uma infecção instalada; o uso profilático em animais ou grupos de animais em que há o risco potencial de infecções; e o uso controverso e já banido em diversos países que consiste em acrescentar esses medicamentos em doses subterapêuticas no alimento e na água dos animais como forma de promover um maior crescimento (HELLIWELL; MORRIS; RAMAN, 2020; PATEL; WELLINGTON; SHAH; FERREIRA, 2020).

O consumo global de antibióticos por meio da aplicação veterinária em animais destinados à alimentação foi estimado em cerca de 63 mil toneladas em 2010, e a expectativa é que esse número chegue próximo a 105 mil toneladas em 2030, acompanhando o crescente número de animais produzidos para esse fim (VAN BOECKEL; BROWER; GILBERT; GRENFELL *et al.*, 2015). Esses números podem estar muito próximos de equiparar aos do consumo de antibióticos em humanos, visto que, por exemplo, no Reino Unido, em 2013, 55% do total de antibióticos foram

destinados ao tratamento de infecções em humanos e 45% ao tratamento de animais (LIMMATHUROTSAKUL; SANDOE; BARRETT; CORLEY *et al.*, 2019).

Dentre os alimentos de origem animal que podem conter resíduos de medicamentos veterinários, o leite merece destaque. Há no mundo mais de 6 milhões de consumidores de leite e derivados. Entre as décadas de 1980 e 2010 houve um aumento de mais de 50% na produção de leite mundial, passando de 500 para 765 milhões de toneladas anuais (KAPAJ; DECI, 2017). No Brasil, a Portaria do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento N° 005 de 24 de abril de 1980 estipula que todo animal submetido ao tratamento com antimicrobiano só deve ser utilizado para o fornecimento de leite após um período mínimo de 72 h (PEREIRA; SCUSSEL, 2017). No entanto, alguns antibióticos podem ser detectados no leite até mesmo após esse período. A penicilina G, por exemplo, pode ser detectada até o sexto dia após o tratamento (SEYMOUR; JONES; MCGILLIARD, 1988).

Essa grande quantidade de antibióticos destinados à prática veterinária deixa resíduos nos alimentos de origem animal que podem gerar diversas consequências aos humanos que se alimentam desses produtos, como a transferência de bactérias resistentes a antibióticos, efeitos imunopatológicos, alergia, mutagenicidade e outros efeitos associados a algumas moléculas específicas como nefropatia, hepatotoxicidade, distúrbios reprodutivos e toxicidade à medula óssea (BACANLI; BAŞARAN, 2019).

As bactérias resistentes resultantes desse processo podem ser transmitidas aos seres humanos não somente por meio dos próprios alimentos, mas também por meio da exposição ocupacional nos criadouros, ao longo da cadeia de produção alimentar e também por vias ambientais como solo e água contaminados (KOCH; HUNGATE; PRICE, 2017). Ainda, a vida selvagem tem sido frequentemente destacada como um possível reservatório secundário de resistência antimicrobiana gerada pelo uso de antimicrobianos na medicina veterinária (BLANCO; LÓPEZ-HERNÁNDEZ; MORINHA; LÓPEZ-CERERO, 2020).

Estudos demonstraram que a redução do uso de antibióticos em animais pode afetar positivamente a disseminação de genes de resistência bacterianos no meio ambiente (ZHOU; ZHU; GILES; DANIELL *et al.*, 2020; ZHU; JOHNSON; SU; QIAO *et al.*, 2013). Para que sejam cumpridas as boas práticas no emprego dessas substâncias se faz necessário o controle dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs)

de antibióticos em alimentos de origem animal, que são determinados atualmente por autoridades regulatórias de diversos países e organizações internacionais, como forma de garantir a segurança do consumidor (ZHENG; WANG; HAN; XU *et al.*, 2013). No Brasil, as metodologias analíticas, a ingestão diária admissível e os LMRs para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal são determinados pela RDC n. 53, de 02 de outubro de 2012 (BRASIL, 2012).

As metodologias analíticas tradicionais para detecção de antibióticos podem ser subdivididas em três categorias principais: métodos de triagem por inibição microbiana, métodos de detecção por cromatografia/espectrometria de massa e métodos de imunoensaio (WANG; ZHAO, 2018). Os ensaios de triagem por inibição microbiana foram os primeiros a serem empregados para a detecção de resíduos de antibióticos e continuam sendo amplamente utilizados principalmente pelo custo baixo, no entanto, alguns destes são considerados trabalhosos ou não apresentam acurácia necessária (PIKKEMAAT, 2009). Os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são altamente sensíveis e específicos, porém os equipamentos apresentam custo alto e normalmente envolvem procedimentos complexos de extração de antibióticos no preparo das amostras (KONG; XIE; LIU; SONG *et al.*, 2017). Os imunoensaios, como o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), também apresentam boa sensibilidade e especificidade, são fáceis de operar, mas demandam um tempo considerável para serem realizados (BELOGLAZOVA; EREMIN, 2015).

Além dos métodos tradicionais empregados para detecção de antibióticos em alimentos de origem animal, e todas as variações dentro desses grupos, outros estudos buscam por métodos que sejam mais rápidos, simples, fáceis, sensíveis e com monitoramento local, como é o caso dos biossensores. Biossensores podem ser definidos como dispositivos integrados compostos de um elemento biológico de reconhecimento acoplado a um elemento detector físico-químico ou transdutor que converte o evento de reconhecimento em informação analítica quantitativa ou semiquantitativa. Esses sensores podem ser compostos por uma ampla variedade de materiais e são apontados como possíveis substitutos dos métodos de triagem biológica (MAJDINASAB; MISHRA; TANG; MARTY, 2020; THÉVENOT; TOTH; DURST; WILSON, 2001).

Dentre as novas tecnologias aplicadas às metodologias analíticas também se destacam aquelas que empregam a nanotecnologia no seu desenvolvimento. A miniaturização de sistemas pode reduzir os tempos de análise ao aumentar as superfícies de interação; além disso, os nanomateriais contribuem para reduzir os limites de detecção por possibilitarem uma maior sensibilidade ao analito. A nanotecnologia aplicada a dispositivos portáteis também permite a estratégia de automonitoramento, como é o caso do automonitoramento dos laticínios, para o qual o rendimento da amostras deve ser muito alto (milhares de amostras por dia) (GAUDIN, 2017).

Tendo em vista um cenário repleto de novas informações sobre metodologias para detecção de antibióticos em alimentos de origem animal, em especial o leite e seus derivados; com pouco consenso entre os documentos legislativos globais, que muitas vezes não acompanham o surgimento de novas tecnologias; e com a crescente produção de leite de origem animal, abordagens como as revisões sistemáticas são estratégias essenciais para reunir, caracterizar e sintetizar as evidências sobre esses métodos. Dessa forma, o presente estudo de revisão sistemática pode servir para nortear não somente os pesquisadores da área, mas também os órgãos responsáveis pela regulamentação e monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em leite e derivados.

2 OBJETIVOS

2. 1 OBJETIVO GERAL

Explorar os métodos para detecção e determinação de resíduos de antibióticos em leite de origem animal e seus derivados que utilizem em sua construção componentes de técnicas nanotecnológicas.

2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver o protocolo para realização de uma revisão sistemática de estudos que desenvolvam metodologias analíticas para detecção de antibióticos no leite animal e/ou seus derivados;
- Identificar os estudos com metodologias analíticas que empreguem nanotecnologia e que avaliem os parâmetros de validação estabelecidos nos critérios de inclusão;
- Caracterizar os estudos quanto ao ano e local de publicação, matrizes empregadas, antibióticos analisados; técnicas analíticas aplicadas e forma de emprego da nanotecnologia;
- Avaliar os dados de validação dos estudos de acordo com o preconizado no guia nacional de validação de métodos analíticos (MAPA), levando em consideração os guias internacionais (EU, FDA).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTIBIÓTICOS

A descoberta e utilização de antibióticos revolucionou o tratamento de doenças causadas por infecções bacterianas, mas não é recente a utilização de moléculas capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos, ainda que de forma empírica. Exemplo disso são as evidências de esqueletos humanos datados entre 350-550 anos a.C. com traços da presença de tetraciclina encontrados no território do atual Sudão (BASSETT; KEITH; ARMELAGOS; MARTIN *et al.*, 1980; NELSON; DINARDO; HOCHBERG; ARMELAGOS, 2010). Outros achados, já da Idade Média, apontam curandeiros da China e da Grécia que utilizavam curativos impregnados com fungos filamentosos para tratar doenças infecciosas (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019).

No entanto, foi apenas a partir do início do século XX que os cientistas Paul Ehrlich, Gerard Domagk e Alexander Fleming se tornaram protagonistas na revolução dos antibióticos graças às suas pesquisas e invenções na área. Paul Ehrlich conduziu estudos que defendiam a ideia de “bala mágica” do inglês “*magic bullet*”, pela qual seria possível encontrar alguma substância capaz de atingir apenas os microrganismos causadores de doenças, sem acarretar danos ao hospedeiro (EHRlich; HATA, 1910). A partir dessa teoria foi realizada uma vasta triagem sistemática em busca de alguma substância capaz de curar a sífilis, o que levou ao desenvolvimento da arsfenamina, composto a base de arsênio que se tornou medicamento na época. Esses estudos contribuíram para além da substância encontrada, já que a abordagem de pesquisa científica introduzida pelo cientista e colaboradores foi utilizada para exploração de várias outras substâncias com potencial terapêutico que possibilitaram, inclusive, a descoberta de outros agentes antimicrobianos (AMINOV, 2010).

Gerard Domagk, tal como Ehrlich aspirava, a partir de testes com inúmeras substâncias, encontrar possíveis agentes antibacterianos. Em seus estudos, ele defendia que o fato de os corantes se ligarem às bactérias poderia ter relação com a inibição do crescimento bacteriano gerando assim um efeito terapêutico em doenças infecciosas. No ano de 1932, Domagk utilizando uma substância nomeada prontosil

conseguiu o efeito desejado com sucesso *in vivo*, mas não *in vitro*. Pesquisas posteriores mostraram então, que o prontossil era um pró-fármaco, que precisa ser metabolizado para ter efeito farmacológico, o responsável pela ação nesse caso era a sulfanilamida. As sulfonamidas, classe derivada dessas descobertas, foram os primeiros agentes antimicrobianos utilizados durante a Segunda Guerra Mundial, precedendo a introdução da penicilina (RIFKIND; FREEMAN, 2005).

Em 1929, Alexander Fleming em um feliz acaso descobriu a penicilina a partir de um fungo do gênero *Penicillium*. Alguns anos depois, após estudos de investigação para aplicação clínica dessa substância, esta acabou se tornando naquela época a melhor opção contra as infecções bacterianas, sendo utilizada até os dias atuais (LIGON, 2004). O sucesso da penicilina abriu as portas para a exploração de microrganismos de outras ordens, como os fungos actinomicetos, e gêneros, como o *Cephalosporium*, o que levou ao desenvolvimento de cefalosporinas, macrolídeos e aminoglicosídeos (ARAKAWA, 2020). A maioria das classes de antibióticos utilizadas atualmente foram identificadas no período de 1940 a 1960, ficando conhecido como a “Era de ouro” desse grupo de medicamentos (DA CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019).

Após a “Era de ouro” a indústria farmacêutica diminuiu gradativamente as pesquisas na área dos antibióticos, principalmente devido a questões comerciais e econômicas, em que medicamentos para uso crônico se tornaram mais atrativos e rentáveis (BARRETT, 2005). Isso pode ser mensurável e constatado pelo número de antimicrobianos aprovados para uso com o decorrer dos anos. Entre os anos de 1983 e 1987, esse número foi de 16 antimicrobianos e caiu para 5 entre os anos de 2003 e 2007 (DEMAIN, 2011). E desde a década de 1980 apenas 3 antibióticos representaram novas classes com mecanismos de ação distintos (HUNT; KIRSCH, 2020). O desinteresse da indústria é também explicado pela dificuldade de isolar novos compostos; o aumento do custo e tempo para realização de ensaios clínicos; e o afastamento da descoberta de produtos naturais em favor da química combinatória, genômica e proteômica (DEMAIN, 2011).

3.1.1 Uso de antibióticos na medicina veterinária

As interações de microrganismos e espécies do reino animal não possuem apenas papel patológico, essas interações são diversas e se apresentam muitas vezes na esfera simbiótica, podendo gerar benefícios mútuos para esses seres vivos. Fato é, todas essas interações em conjunto promovem homeostase no ecossistema em que esses organismos habitam naturalmente (MCFALL-NGAI; HADFIELD; BOSCH; CAREY *et al.*, 2013). Com a domesticação de animais e o desenvolvimento de práticas intensivas na pecuária, esse cenário de equilíbrio foi modificado gradativamente. O estresse sofrido no confinamento que compromete a função imunológica dos animais, a alta eliminação de resíduos com a disseminação microbiana para o meio ambiente e outros aspectos naturais transfigurados reforçaram o papel patológico desses microrganismos que se tornaram uma grande preocupação para a produção animal e para a saúde humana (SHOJADOOST; YITBAREK; ALIZADEH; KULKARNI *et al.*, 2021; YADAV; SATHEESH KUMAR, 2020).

Dessa forma, o uso de antibióticos em animais de criação acompanhou de forma geral a história do uso dos antibióticos em humanos. Na “era das sulfonamidas”, iniciada na década de 1930, esse grupo de substâncias começou a ser utilizado como antisséptico na pecuária. A partir de 1950, penicilinas, estreptomicinas, tetraciclina e cloranfenicol foram amplamente inseridos na medicina veterinária com bases quase sempre empíricas. Também nesse período, os antibióticos começaram a ser adicionados à ração como fator estimulante de crescimento (PRESCOTT, 2017; ROCHA; DA SILVA ROCHA; TAVARES; DE MORAIS CALADO *et al.*, 2021).

Já na década de 1960, as consequências negativas do uso irracional desses medicamentos em animais de criação começaram a ser identificadas. A descoberta de plasmídeos de resistência a múltiplos fármacos em enterobactérias colaborou para os estudos de resíduos de antibióticos e para a remoção de alguns antimicrobianos da prática de promoção de crescimento, restringindo-os ao tratamento de infecções. Em 1972, a FDA (*Food and Drug Administration*) recomendou que tetraciclina e penicilinas não fossem mais utilizadas em doses subterapêuticas na ração dos animais, e em meados da década de 1970 o uso do cloranfenicol foi banido nos Estados Unidos e na Dinamarca pela possível toxicidade em humanos por meio dos resíduos deixados nos alimentos de origem animal. Nas décadas subsequentes, as restrições e o melhor manejo dos antibióticos foram sendo realizados ao passo que as resistências bacterianas e toxicidades foram sendo documentadas. Só na década

de 2010, antibióticos exclusivos para o uso animal foram introduzidos no mercado, com a avilamicina como pioneira, essa estratégia foi implementada com a intenção de minimizar o surgimento de resistência para aqueles antibacterianos de uso humano em decorrência das práticas pecuaristas. Essa tendência em buscar alternativas antimicrobianas limitadas ao uso animal persiste até os dias atuais (PRESCOTT, 2017).

Apesar desses esforços, os antibióticos mais utilizados em animais até o momento são aqueles compartilhados com a medicina humana, sendo que estes pertencem às classes das penicilinas, das sulfonamidas e das tetraciclinas (VAN BOECKEL; PIRES; SILVESTER; ZHAO *et al.*, 2019). Ainda, estima-se que atualmente mais da metade dos antibióticos produzidos no mundo são destinados a animais e grande parte desses medicamentos são utilizados na pecuária industrial (DAVID; BUCHET; SIALELLI; DELOUVÉE, 2020). Somado a esses fatores, os animais não humanos não são capazes de metabolizar antibióticos de forma eficaz. Esses fármacos podem ser completamente metabolizados ou uma porção pode ser excretada pela urina ou fezes em seu estado original e também como metabólitos ativos/não ativos (QUAIK; EMBRANDIRI; RAVINDRAN; HOSSAIN *et al.*, 2020). Para alguns antibióticos, a excreção chega a ser de 90% dos compostos originais (KIVITS; BROERS; BEELTJE; VAN VLIET *et al.*, 2018).

3.1.2 Resistência bacteriana

O arsenal de antibióticos adquirido ao longo dos anos é considerável, mas fatores como o decrescente desenvolvimento de novos antibióticos atrapalham o atual tratamento de infecções bacterianas. O surgimento de resistência de microrganismos aos antibióticos representa talvez o maior desafio. O problema foi alertado por Fleming ao *The New York Times* ainda na primeira metade do século passado no ensaio *Penicillin's Finder Assays Its Future* (1945, p.21) que relatou a necessidade iminente do uso racional de antibióticos para que a seleção de bactérias resistentes fosse prevenida (FLEMING, 1945).

Bactérias adquirem resistência de formas variadas, algumas consideradas intrínsecas, como aquelas relacionadas às mudanças espontâneas que se originam nos genes do próprio genoma bacteriano, sem que haja algum estímulo do ambiente

para tal. Entretanto, a resistência também pode ser causada por um estímulo do meio, e esta é geralmente a causa mais comum. Quando na presença de um antibiótico mesmo que em doses subterapêuticas, a bactéria pode selecionar uma resposta adaptativa e se tornar resistente àquele determinado antibiótico (BERGLUND, 2015). É também possível que a bactéria adquira os genes responsáveis pela resistência, visto que eles podem ser incorporados pelo organismo por meio da conjugação entre duas bactérias, em que uma transfere à outra o material genético que confere resistência; por meio da transformação, em que um microrganismo absorve o material genético de uma bactéria morta; e também por meio da transdução, em que um vetor, normalmente um bacteriófago, realiza a transferência de genes de uma bactéria para outra (ALANIS, 2005; KHAMENEH; DIAB; GHAZVINI; FAZLY BAZZAZ, 2016).

Independentemente do mecanismo, é fato consensual atualmente que a resistência bacteriana frente aos antibióticos é considerada inevitável após um certo período de uso da substância (MARTINEZ; WATTS; GILBERT, 2019; SINGH, 2014). Ao longo dos anos, algumas estratégias foram sendo adotadas para tentar retardar o surgimento de cepas bacterianas resistentes. Nesse caso, a maioria das estratégias envolvem o uso racional desses medicamentos, sendo importante a elaboração e utilização de diretrizes que estabeleçam as medidas necessárias para contenção do problema (LEE; CHO; JEONG; LEE, 2013). Também surgiram estratégias farmacológicas como a união de inibidores do mecanismo de resistência com o antibiótico atingido por este mecanismo em um mesmo tratamento, um exemplo seriam as formulações que combinam o ácido clavulânico e antibióticos beta-lactâmicos. No entanto, esse tipo de solução não é trivial e, assim como novas moléculas antimicrobianas, requer grandes investimentos em estudos na área de desenvolvimento de fármacos (DAVIES; DAVIES, 2010). As alternativas que vão além do desenvolvimento de novos fármacos consideram terapias combinadas, em favor da formação de complexos; agentes antibacterianos naturais como peptídeos; e a aplicação de sistemas à base de nanopartículas para lidar com a resistência microbiana (JELINKOVA; MAZUMDAR; SUR; KOCIOVA *et al.*, 2019).

Esse panorama de surgimento de resistência bacteriana é certamente agravado pelo excesso de antibióticos utilizados na pecuária, contribuindo para que essa seja uma das dez principais ameaças à saúde global segundo a OMS (BUCHY; ASCIOGLU; BUISSON; DATTA *et al.*, 2020). A *Salmonella* e *Escherichia coli*, por

exemplo, são relatadas como resistentes em bovinos, com foco na *S. typhimurium* DT 104, um patógeno virulento para humanos e animais com múltiplas resistências a antibióticos como ampicilina, tetraciclina, sulfanomidas, estreptomicina, cloranfenicol e fluoroquinolonas (KLEIN; FRANZ, 2005; POPPE; SMART; KHAKHRIA; JOHNSON *et al.*, 1998). Na medicina humana, os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento de infecções graves por *Campylobacter* são as fluoroquinolonas e os macrolídeos. No entanto, o uso de fluoroquinolonas na medicina veterinária levou ao surgimento de *C. jejuni* resistente a antibióticos em populações humanas e de galinhas (KLEIN; FRANZ, 2005). A vancomicina e teicoplanina são antibióticos glicopeptídeos reservados na medicina humana para o tratamento de infecções graves por enterococos (*E. faecium* e mais frequentemente *E. faecalis*); já a avoparcina, com estrutura semelhante à vancomicina, é utilizada como fator de crescimento em animais desde os anos 1980 (WITTE, 1997). Na Europa, essa ligação relacionou o uso da avoparcina ao aumento de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) em hospitais, uma vez que isolados de VRE podem ser transmitidos a humanos por meio da cadeia alimentar (BATES; JORDENS; GRIFFITHS, 1994; KLARE; HEIER; CLAUS; BÖHME *et al.*, 1995; MCDONALD; KUEHNERT; TENOVER; JARVIS, 1997).

3.1.3 Alimentos de origem animal e resíduos de antibióticos

Além das questões ambientais e de resistência bacteriana ao longo da cadeia produtiva, o excesso de antibióticos no manejo de animais de criação gera outras preocupações, nesse caso em relação aos resíduos de antibióticos deixados nos alimentos de origem animal. De forma geral, duas situações podem ser destacadas: a primeira em que os antibióticos residuais se tornam potencial de toxicidade direto a humanos; e a segunda em que os baixos níveis de exposição a antibióticos podem resultar em alteração das microbiotas corporais, causando doenças oportunistas e o possível desenvolvimento de cepas resistentes que causariam falha de uma terapia antibiótica futura (NISHA, 2008).

Um nível baixo de contaminação por medicamentos, por si só, pode não criar um problema grave imediato para a saúde pública. No entanto, com o uso generalizado de medicamentos e resíduos antibióticos cada vez mais frequentes na

alimentação, o risco de um efeito adverso causado por esses resíduos pode ser potencializado (PRAJWAL; VASUDEVAN; SATHU; PAME, 2017). Um exemplo são os antibióticos beta-lactâmicos, que podem causar erupções cutâneas, dermatite, sintomas gastrointestinais e anafilaxia mesmo em doses muito baixas. Fazem parte dessa classe as penicilinas e cefalosporinas (PAIGE; TOLLEFSON; MILLER, 1997). Além desses, outros exemplos são: o cloranfenicol, considerado mielotóxico; a sulfametazina, a oxitetraciclina e a furazolidona, consideradas carcinogênicas; e a gentamicina, que tem potencial para desenvolver nefrotoxicidade (NISHA, 2008).

Alguns estudos vêm demonstrando que os LMRs de antibióticos em alimentos de origem animais estabelecidos pelas organizações internacionais, como a União Europeia, não estão sendo devidamente cumpridos. Em um estudo de 2020, pesquisadores analisaram peixes comercializados em mercados argentinos e identificaram que a doxiciclina, a oxitetraciclina e a sulfametazina excederam seus respectivos LMRs nas amostras colhidas. Além disso, foram detectados também alguns antibióticos proibidos na produção de alimentos pelo seu potencial tóxico relatado anteriormente, como cloranfenicol, furazolidona e nitrofurantoína (GRIBOFF; CARRIZO; BONANSEA; VALDÉS *et al.*, 2020).

3.1.4 Leite e derivados

A secreção do leite nos animais necessita de um alto índice metabólico e, por ser uma prioridade, é mantida à custa de outros processos reprodutivos e metabólicos. Contudo, não há uma correlação clara entre a produção de leite e a incidência de doenças, isso porque o manejo e a nutrição desses animais possuem grande impacto na sua saúde. No entanto, o surgimento de doenças nos animais produtores de leite é muito comum, e os termos “doenças de produção” ou “doenças relacionadas à produção” são frequentemente utilizados para se referir às doenças induzidas ou exacerbadas por práticas de manejo, como as doenças metabólicas (hipocalcemia, cetose, metrite e cistos ovarianos), mastite, claudicação e infertilidade, que frequentemente envolvem agentes infecciosos (FLEISCHER; METZNER; BEYERBACH; HOEDEMAKER *et al.*, 2001; NIR, 2003).

A mastite, manifestada como uma inflamação normalmente acompanhada de infecção da glândula mamária, é a doença bacteriana mais comum na maioria dos

animais produtores de leite. O seu tratamento ou a prevenção medicamentosa são responsáveis pelo consumo da maioria dos antimicrobianos administrados no gado leiteiro adulto (METZGER; HERNANDEZ; SUEN; RUEGG, 2018; VASQUEZ; GANDA; CAPEL; EICKER *et al.*, 2019). O tratamento da mastite é possível com a aplicação de antibióticos de ação prolongada, mas o leite desse animal produtor não é comercializável até que os resíduos do fármaco não sejam detectados no leite, e a mastite pode ser reincidente mesmo após o tratamento com antibióticos de ação prolongada. Consequentemente, a mastite é uma doença que acarreta custos altos e ainda é potencialmente fatal no que diz respeito à sobrevivência animal. Os antibióticos mais utilizados para o tratamento da mastite são as penicilinas, a ampicilina, as cefalosporinas e as tetraciclina, comumente administrados por infusão intramamária de uma pomada, ou injeção intramuscular ou intravenosa (BHOSALE; OSMANI; GHODAKE; SHAIKH *et al.*, 2014).

Infelizmente, alguns produtores recorrem a métodos ilegais para que os antibióticos não sejam detectados nas análises. Um exemplo é a utilização de beta-lactamases para destruição dos antibióticos beta-lactâmicos, e como não se tem estudos suficientes para avaliar a segurança e viabilidade dessa prática, ela é considerada ilegal (WANG; LIU; XU; MA *et al.*, 2013). No Brasil, um estudo com mais de 900 amostras de leite do comércio local não detectou antibióticos acima do LMR, no entanto apontou a presença de antimicrobianos como a doxiciclina que não deveriam ser encontrados em nenhuma concentração pois não tem seu uso regulamentado para animais produtores de leite no país. Ainda, alertaram ao fato de que apesar de os antibióticos permitidos para uso estarem abaixo dos limites máximos, algumas amostras eram compostas por leite de diversas fazendas e que na realidade podem ter sofrido um efeito de diluição (DE NOVAES; SCHREINER; E SILVA; FRANCO, 2017).

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

Tendo em vista a ampla utilização de medicamentos antimicrobianos em animais; a importância dessas moléculas para medicina humana e veterinária; a quantidade de resíduos que podem permanecer nos alimentos e/ou serem dispersados no meio ambiente, se faz necessário então, métodos analíticos efetivos

que consigam detectar e quantificar essas substâncias para que as práticas pecuaristas se mantenham as menos prejudiciais possíveis.

Técnicas analíticas são quaisquer princípios físicos ou químicos que podem ser aplicados para estudar um analito; já os métodos analíticos são as aplicações dessas técnicas para um analito específico em uma matriz específica. Esses métodos podem envolver análises qualitativas, que por definição estabelecem a identidade química das espécies presentes em uma amostra; e a análise quantitativa, que determina as quantidades relativas e absolutas das espécies, ou analitos, em termos numéricos (HARVEY, 2011; SKOOG; HOLLER; CROUCH; WEST, 2005).

Os métodos qualitativos envolvem, então, a determinação da presença da substância química de interesse na amostra. As técnicas utilizadas para a análise qualitativa em alimentos podem incluir cromatografia em camada delgada e o uso de kits de testes rápidos. Já os métodos quantitativos envolvem a determinação da abundância absoluta ou relativa (normalmente expressa como uma concentração) de uma, várias ou todas as substâncias particulares de interesse presentes na amostra analisada. Métodos cromatográficos mais instrumentais, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são os mais comumente empregados para detecção e quantificação de analitos em amostras de alimentos (MENKEM; NGANGOM; TAMUNJOH; BOYOM, 2019; PIETSCHMANN; DITTMANN; SPIEGEL; KRAUSE *et al.*, 2020).

A detecção de moléculas antibióticas no leite pode ser especialmente difícil, pois quando as concentrações de células somáticas, lisozima, lactoferrina, gordura e proteínas aumentam no leite, geralmente há um aumento da taxa de resultados falso-positivos em testes de triagem de antibióticos. Por isso, técnicas analíticas sensíveis e com alta seletividade são necessárias para identificar e quantificar os resíduos de antibióticos no leite (TASCI; CANBAY; DOGANTURK, 2021).

3.2.1 Métodos de triagem

Os métodos de triagem são amplamente utilizados para a determinação de resíduos de antibióticos em amostras de alimentos. Um método de triagem é um processo que extrai, isola e identifica um composto ou grupo de componentes em uma amostra com o número mínimo de etapas e a menor manipulação da amostra.

Normalmente, um método de triagem fornece uma resposta binária “sim / não”. Em geral, tendem a ter uma ênfase qualitativa em vez de quantitativa, envolvem pouco ou nenhum tratamento de amostra, são rápidos e a resposta é utilizada para a tomada de decisão imediata, contudo essa resposta às vezes requer confirmação por outro método (MUÑOZ-OLIVAS, 2004).

Os métodos de triagem podem ser classificados em dois grupos principais de acordo com a reação específica que ocorre: os ensaios microbiológicos e os imunoensaios. Além disso, também são considerados métodos de triagem os testes microbiológicos comerciais, uma forma mais rápida e menos instrumental dos ensaios microbiológicos convencionais, e os biossensores. Os ensaios microbiológicos são métodos qualitativos ou semiquantitativos, baseados em uma reação específica entre um organismo suscetível (geralmente bactérias) e o antibiótico presente na amostra. Os ensaios microbiológicos possuem sistema de detecção por condutimetria, luminescência, UV/Vis e zona de inibição. O grupo dos testes microbiológicos comerciais se tornou muito popular, especialmente para detecção de antibióticos no leite. Várias empresas os produzem sob diferentes nomes comerciais, como Delvotest, teste BR, teste Eclipse, entre outros. Esses testes podem ser realizados por não profissionais e aplicados “*on-farm*”, que seria no local de produção animal (CHÁFER-PERICÁS; MAQUIEIRA; PUCHADES, 2010).

Já os imunoensaios são métodos semiquantitativos caracterizados por sua alta seletividade, alta sensibilidade, simplicidade e custo-benefício. São baseados na reação específica entre um anticorpo e um antígeno. Os imunoensaios mais comuns são o ELISA e os fluoroimunoensaios, sendo que outros exemplos são os imunoensaios de quimioluminescência, radioimunoensaio e imunoensaio de ouro coloidal. Apesar das vantagens citadas anteriormente, cada ensaio apresenta suas desvantagens. No ELISA, por exemplo, a etapa de preparo da amostra é necessária, e outras questões problemáticas como variabilidade de anticorpos, reatividade cruzada e falso positivo podem afetar os resultados (AHMED; NING; PENG; CHEN *et al.*, 2020).

Os métodos eletroanalíticos vêm ganhando destaque no monitoramento de resíduos de antibióticos em amostras de leite devido às características de portabilidade, simplicidade, baixo custo instrumental e de análise. Dessa forma, os biossensores representam uma abordagem promissora porque podem operar de

forma automática. De acordo com a definição de biossensor estabelecida, estes precisam conter um elemento de reconhecimento biológico (enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, células ou tecidos) acoplado a um elemento de transdução de sinal. Podem ser classificados de acordo com o mecanismo biológico empregado ou o modo físico-químico de transdução de sinal. Nesse sentido, existem os biossensores enzimáticos, os imunossensores e os biossensores microbiológicos (DE FARIA; LISBOA; CAMPOS; ALVES *et al.*, 2021; PATEL, 2002).

Há um grande interesse no desenvolvimento de métodos de triagem por serem rápidos e de alto rendimento. Somado a isso, há uma tendência em miniaturizar sistemas de triagem (chips, *microarrays*, placas de microtitulação), bem como para a automação dos ensaios. Por essas razões, os estudos mais recentes na área devem envolver o uso de nanotecnologia para garantir o controle da segurança dos alimentos (CHÁFER-PERICÁS; MAQUIEIRA; PUCHADES, 2010).

3.2.2 Métodos confirmatórios

As técnicas aplicadas nos métodos de triagem são bastante úteis e têm sua importância para estabelecer um plano de monitoramento, analisar um grande número de amostras, economizar tempo e custos laboratoriais, mas devem ser avaliados cuidadosamente em termos de confiabilidade para a detecção de resíduos de antibióticos considerando a porcentagem de resultados falsos (BONERBA; PANSERI; ARIOLI; NOBILE *et al.*, 2021). Além disso, métodos de triagem como os microbiológicos costumam ser pouco sensíveis, e por isso não conseguem distinguir uma substância da outra, o que pode ser problemático levando em consideração que cada antibiótico possui um LMR (MORETTI; DUSI; GIUSEPPONI; PELLICCIOTTI *et al.*, 2016).

Ao longo da década de 2000, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem se destacou como método confirmatório de amostras suspeitas na análise de rotina de alimentos. Os métodos baseados na detecção por CLAE-MS/MS são considerados hoje como métodos de confirmação porque esse tipo de método fornece informações completas ou complementares, permitindo que as substâncias sejam identificadas de forma inequívoca e, se necessário, quantificadas ao nível de interesse. São, portanto, seletivos e sensíveis, mas normalmente não são

adequados para uma ampla triagem, pois geralmente, são desenvolvidos para determinar apenas uma única classe de medicamentos (MORETTI; DUSI; GIUSEPPONI; PELLICCIOTTI *et al.*, 2016). Nos últimos anos, portanto, um grande esforço tem sido feito para desenvolver protocolos de CL-MS/MS incluindo mais de uma classe de antimicrobianos para realizar uma triagem mais eficiente e extensa em vários alimentos (MARTOS; JAYASUNDARA; DOLBEER; JIN *et al.*, 2010).

Outras técnicas vêm sendo estudadas para a detecção e a quantificação de antibióticos em alimentos, em especial no leite, como espectroscopia Raman, que possibilita uma detecção rápida e não destrutiva da amostra; eletroforese em gel e eletroforese capilar; e diversas outras variações de cromatografia líquida (HE; SUN; PU; CHEN *et al.*, 2019; KANTIANI; FARRÉ; BARCELÓ, 2009).

As análises por métodos confirmatórios normalmente exigem a extração do analito no preparo da amostra para evitar efeitos interferentes da matriz. No caso do leite, o principal objetivo costuma ser precipitar as proteínas e remover os lipídeos. Os métodos gerais mais comuns de extração do analito são a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS) (TIAN; WANG; ZHANG; LI *et al.*, 2016). Normalmente, a extração de antibióticos do leite inclui duas etapas. A primeira etapa é a precipitação da proteína por solvente orgânico com ou sem ácido forte (ex. ácido tricloroacético) e a segunda etapa é a etapa de limpeza com EFS (RAGEH; ABDEL-RAHIM; ASKAL; SALEH, 2019). A EFS é baseada na distribuição seletiva de analitos entre o material sólido em uma coluna e a fase móvel líquida, muito similar aos princípios da cromatografia líquida, nesse caso ela é utilizada não só para remover interferentes da amostra, mas também para aumentar a concentração de analitos presentes em nível de traços. As técnicas de extração em fase sólida estão em constante aprimoramento por se tratar de uma etapa crucial da metodologia analítica. Assim, a síntese de novos materiais sólidos e separação baseada em micro e nanoescala são promessas de métodos cada vez mais rápidos e sensíveis (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012; CUTIGNANO, 2019).

3.2.3 Nanotecnologia aplicada a metodologias analíticas

A nanotecnologia é uma grande área da ciência que envolve a engenharia de partículas em escala nanométrica (1 nanômetro = 1 bilionésimo do metro) de uma

vasta gama de materiais, como metais e polímeros. Uma das possíveis definições para a nanotecnologia é “a criação e o uso de estruturas, dispositivos e sistemas que têm novas propriedades e funções devido ao seu pequeno tamanho”. Isso significa que as propriedades dos materiais mudam conforme seu tamanho se aproxima da nanoescala porque a porcentagem de átomos na superfície desse material se torna significativamente maior. À medida que o tamanho da partícula é alterado, a química da superfície muda, levando a diferentes interações de superfície no ambiente da partícula, essas diferenças são exploradas para a aplicações dos nanomateriais (KHARE; WILLIAMS; GOKULAN, 2014).

A nanotecnologia, assim como em outras áreas, tem sido aplicada com sucesso em diversos setores da garantia de qualidade e segurança dos alimentos e embora as metodologias clássicas de análises, tanto em relação à triagem quanto à confirmação, consigam detectar com sucesso boa parte dos antibióticos que precisam ser monitorados, o desenvolvimento de dispositivos e técnicas nanotecnológicas podem preencher as deficiências dos métodos clássicos, com maior rapidez e sensibilidade na detecção, além de facilitar a preparação de amostras e tornar as análises ainda mais precisas e econômicas (PATEL; PATRA; SHAH; KHEDKAR, 2018).

Atualmente, destaca-se o desenvolvimento de novos sensores eletroquímicos que utilizam eletrodos com superfícies à base de ouro e principalmente de carbono, como grafite, *carbon black* (CB), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NCPM) e óxido de grafeno reduzido (RGO). Esses materiais nanoestruturados podem fornecer efeitos eletrocatalíticos, aumentar a área eletroativa e melhorar a transferência de elétrons, o que resulta em sensores eletroquímicos altamente sensíveis. Aptâmeros têm sido aplicados no desenvolvimento de biossensores (aptasensores) eletroquímicos a fim de adicionar maior seletividade. Os aptâmeros são sequências de DNA de fita simples (ssDNA) ou RNA, que permitem o reconhecimento de várias moléculas alvo com alta especificidade e afinidade. Eles têm sido amplamente associados a materiais nanoestruturados (nanomateriais) para se desenvolver sensores aprimorados, devido a um efeito sinérgico desta combinação, para detecção de antibióticos (DE FARIA; LISBOA; CAMPOS; ALVES *et al.*, 2021). Os aptasensores, além da aplicação eletroquímica, também são explorados em outras técnicas, como microbalança de cristal de quartzo, ressonância de plasmon

de superfície, fluorescência e colorimetria, essa última com destaque para os aptasensores colorimétricos contendo nanopartículas de ouro (AuNPs) que apresentam propriedades ópticas únicas fortemente relevantes para detecção visual de analitos (WU; HUANG; WU, 2020).

Font *et al.* (2008) descreveram a produção de anticorpos utilizando hapteno, substância antigênica, combinada a nanopartículas magnéticas com o objetivo de alcançar a detecção imunoquímica direta de antibióticos sulfonamidas em amostras de leite. O uso de esferas magnéticas pode auxiliar na minimização de interferentes da matriz, aumentando a eficiência das etapas de lavagem e separação, além de melhorar o desempenho devido ao aumento da área superficial e à cinética de ensaio mais rápida, devido à imunorreação que ocorre em suspensão (FONT; ADRIAN; GALVE; ESTÉVEZ *et al.*, 2008).

As nanopartículas magnéticas vêm sendo aplicadas em especial na técnica de extração magnética em fase sólida (MSPE), em que o emprego desses nanomateriais principalmente como adsorventes têm gerado resultados promissores. Na MSPE o material adsorvente é utilizado tanto para adsorver quanto para dessorver os analitos com o auxílio de um ímã no processo de preparação da amostra. Essa técnica reduz consideravelmente o tempo e a quantidade de solventes orgânicos aplicados, além de favorecer o transporte rápido dos analitos, quando comparada a uma extração convencional. Para o desenvolvimento do MSPE, é comumente utilizada a magnetita (Fe_3O_4) sintetizada a partir de materiais de reconhecida capacidade de adsorção, como nanotubos de carbono, grafeno e polímeros molecularmente impressos (MIPs) (FLOREZ; DUTRA; BORGES, 2019).

3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validação de um método analítico é o termo dado ao processo em que se prova que um método analítico desenvolvido é aceitável para aquilo que se propõe. Ou seja, o objetivo final do processo de validação é fornecer evidências de que o método está pronto para obter resultados confiáveis. A validação de metodologias analíticas é então realizada para possibilitar que todas as medições futuras na análise de rotina serão próximas o suficiente do valor verdadeiro do analito presente na amostra em concentrações a princípio desconhecidas. A necessidade de laboratórios utilizarem

métodos totalmente validados é universalmente aceita como uma forma de obter resultados fidedignos. Existem diversos documentos sobre a validação de métodos, que incluem informações sobre a obtenção dos diferentes parâmetros de desempenho que devem ser analisados. As características clássicas de desempenho são: exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, recuperação, robustez, sensibilidade e seletividade/especificidade, mas essas características podem variar de acordo com o tipo de método e os próprios guias de validação (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020). Para o presente trabalho, foram preconizados os parâmetros estabelecidos pelo MAPA no “Manual de garantia de qualidade analítica – Resíduos e contaminantes em alimentos”, e os guias e manuais de validação de métodos analíticos “*European Commission Decision 2002/657/EC*” na União Europeia e o “*Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products*” do FDA como parâmetros internacionais (BRASIL, 2011; EU, 2002; FDA, 2019).

3.3.1 Seletividade

É bastante comum confundir seletividade com especificidade e vice-versa, no entanto, ambos os termos diferem de maneira expressiva. De acordo com a recomendação da “*International Union of Pure and Applied Chemistry*” (IUPAC) o termo seletividade deve ser preferencialmente utilizado. A especificidade descreve uma situação ideal, na qual apenas um composto influencia o dispositivo de medição. Levando em consideração o número de possíveis espécies químicas presentes em uma amostra real, a especificidade é praticamente impossível de ser alcançada (VESSMAN; STEFAN; VAN STADEN; DANZER *et al.*, 2001).

A seletividade é, então, a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a ser analisada e substâncias análogas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, isóbaros e componentes que possam gerar interferência poliatômica, entre outras) que podem estar presentes na amostra (BRASIL, 2011). A forma mais comumente utilizada para estabelecer a seletividade é a aplicação de técnicas de extração para alterar a composição da matriz para uma mais simples e conhecida. Portanto, é importante

aplicar uma técnica de extração adequada e ideal durante o desenvolvimento do procedimento analítico (KONIECZKA, 2012).

3.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) pode ser definido de forma mais geral como a quantidade ou concentração mínima do analito detectável pelo procedimento analítico, que pode ser distinguida de zero de forma confiável. Existem várias abordagens conceituais para o assunto, cada uma fornecendo uma definição um pouco diferente de LD e, conseqüentemente, a metodologia utilizada para calcular o LD derivado dessas definições (BERNAL, 2014). O conceito aceito pelo manual proposto pelo MAPA é o estabelecido pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), em que o LD é o valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um constituinte em um material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença (BRASIL, 2011; INMETRO, 2012).

Já o limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a concentração mais baixa na qual o analito pode não apenas ser detectado de forma confiável, mas na qual algumas metas predefinidas de viés e imprecisão são atendidas. O LQ pode ser equivalente ao LD ou pode estar em uma concentração muito maior (ARMBRUSTER; PRY, 2008). O VIM não define esse termo, e para o manual do MAPA o LQ pode ser definido como a menor concentração ou teor que pode ser quantificado com a maior incerteza aceitável ou incerteza máxima aceitável (I_{max}). Logo, para se estabelecer o LQ segundo o manual é necessário primeiramente estabelecer a I_{max} para cada combinação analito-matriz do escopo analítico, que pode ser obtida por resoluções legais ou mesmo por decisão interna do laboratório (BRASIL, 2011).

3.3.3 Linearidade

A qualidade de um método analítico é altamente dependente da linearidade da curva de calibração. Uma curva de calibração linear é uma indicação positiva do desempenho do ensaio em uma faixa analítica validada. A curva de calibração no método analítico é uma relação linear entre a concentração (variável independente) e

a resposta (variável dependente). Essa relação é construída para prever as concentrações desconhecidas do analito em uma matriz complexa (MOOSAVI; GHASSABIAN, 2018).

Uma definição muito similar pode ser encontrada no manual do MAPA, em que a linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (faixa de linearidade). Para isso é necessário construir uma curva de calibração com no mínimo cinco níveis de concentração, compreendendo 1, 1,5 e 2,0 vezes o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) ou 0,5, 1,0 e 1,5 vez o LMR, em cinco ou mais replicatas (BRASIL, 2011).

3.3.4 Precisão

A precisão é o conceito em se mede o quão próximas são as medidas individuais do método umas das outras, sendo que ela pode ser composta por três componentes: a repetitividade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade. A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição. A precisão intermediária, também chamada de reprodutibilidade intralaboratorial, é avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras, se necessário (BRASIL, 2011). Já a reprodutibilidade de um procedimento analítico pode ser estimada somente mediante a participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo (EC), ou seja, as análises são realizadas em diferentes laboratórios, sendo que esse tipo de avaliação é raramente realizado (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011).

Para análise de resíduos de medicamentos, como os antibióticos, em matrizes de origem animal, a repetitividade e a reprodutibilidade intralaboratorial são requeridas para avaliar a precisão na validação do método analítico proposto. Para avaliar a repetitividade é necessário preparar e analisar um conjunto de amostras constituídas de matrizes brancas fortificadas ou de material de referência certificado (MRC), no mínimo em três níveis de concentração, com os analitos, de tal forma que os limites permitidos se encontrem preferencialmente na região central dos níveis de

concentração e para nível de concentração e a análise deve ser realizada em, pelo menos, seis réplicas independentes. O mesmo deve ser feito para a reprodutibilidade intralaboratorial, mas nesse caso os passos devem ser repetidos pelo menos mais duas vezes em condições distintas (BRASIL, 2011).

3.3.5 Recuperação/Veracidade

A porcentagem de recuperação é determinada pela razão entre a média experimental e o valor certificado, também pode ser utilizada para expressar a acurácia. O valor certificado é assumido como 100%, e o valor determinado corrigido pelas diluições é considerado o valor experimental (MARSON; CONCENTINO; JUNKERT; FACHI *et al.*, 2020). Os ensaios de recuperação devem utilizar, portanto, material de referência certificado (MRC), e caso não haja MRC disponível, a determinação da recuperação deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada. Ainda, na falta de uma matriz branca pode-se utilizar uma amostra de ensaio com baixa concentração do analito (BRASIL, 2011).

A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas analíticas realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como limpeza (*clean-up*), diluição ou pré-concentração, derivatização e secagem. Normalmente é expressa em porcentagem (MARSON; CONCENTINO; JUNKERT; FACHI *et al.*, 2020).

3.3.6 Efeito matriz

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar as possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental indesejada. Esse aspecto deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a substância referência do analito em solvente e com a amostra (matriz) fortificada com a substância referência do analito. O estudo de efeito matriz não

necessita ser realizado no caso de se utilizar uma curva de calibração da matriz branca fortificada (BRASIL, 2011; 2017).

3.3.7 Robustez

A robustez de um procedimento analítico pode ser definida como a medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas mas deliberadas variações nos parâmetros operacionais do método (BRASIL, 2011). A avaliação da robustez de um procedimento analítico pretende, então, avaliar o quão sensível o resultado analítico é a variações nas condições experimentais como condições ambientais e/ou de preparação da amostra, origem e estabilidade dos reagentes, composição da amostra, tamanho (massa ou volume) da amostra, as condições de pH, temperatura, entre outros (BURNS; DANZER; TOWNSHEND, 2009).

A robustez não é uma grandeza física ou química, logo, não se pode obter um valor numérico para esse aspecto. Para avaliar a robustez, verifica-se experimentalmente se a variação de cada fator estudado tem um efeito expressivo sobre a qualidade metrológica da resposta analítica. Se nenhum dos fatores estudados, plausíveis de afetar o resultado da medição, tiver efeito considerável, o procedimento analítico é considerado robusto. Um procedimento robusto produz resultados mais reprodutíveis ao longo do tempo e apresenta maiores chances de ser adequadamente reproduzido em outros laboratórios, de diferentes localidades (BRASIL, 2011).

Dessa forma, para avaliar a robustez do método pode ser feita a análise de um MRC, um padrão ou uma matriz branca fortificada em no mínimo dois níveis para cada fator que pode afetar o resultado da análise. É aconselhável replicar os experimentos (BRASIL, 2011).

3.4 LEGISLAÇÃO

A acessibilidade desregulada dos pecuaristas e criadores de modo geral aos agentes antimicrobianos contribui para o uso excessivo desses medicamentos e consequentemente para o aumento nos níveis de resíduos nos alimentos produzidos. Isso é especialmente problemático em áreas onde há escassez de veterinários, como

em áreas remotas e essencialmente rurais. Além disso, em alguns países os antibióticos estão prontamente disponíveis para os produtores em drogarias, sem receita de veterinários registrados ou pessoal autorizado (HASSAN; EL ZOWALATY; LUNDKVIST; JÄRHULT *et al.*, 2021). Vários fatores, incluindo a falta de conhecimento entre os fazendeiros e os outros profissionais envolvidos no manejo dos animais, a falta de serviços veterinários adequados em áreas rurais e remotas e a atração pelos lucros gerados pela alta produtividade garantida pelo uso dos antibióticos contribuem para o problema (REDDING; BARG; SMITH; GALLIGAN *et al.*, 2013).

Um limite máximo de resíduo (LMR) é definido como a concentração máxima de resíduo que se espera encontrar se um medicamento veterinário for administrado de acordo com as boas práticas no uso de medicamentos veterinários e que é aceitável em um alimento (MACLACHLAN; MUELLER, 2012). Uma metodologia analítica ideal deve detectar os antimicrobianos em ou, preferencialmente, abaixo desses limites estabelecidos. Em nível internacional, alguns documentos como os produzidos pela comissão do *Codex Alimentarius*, criada pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) são responsáveis por estabelecer os LMRs (MOREIRA, 2012). Nesse caso, os documentos da *Codex Alimentarius* têm como finalidade orientar e promover definições e requisitos aplicáveis aos alimentos para promover uma homogeneização e, desta forma, facilitar o comércio internacional. Também no âmbito internacional os regulamentos da União Europeia (UE), como o 37/2010, também listam as substâncias possivelmente administradas em animais e os seus respectivos LMRs e, ainda, sinaliza aquelas substâncias que são consideradas proibidas e não devem ser encontradas (STEAD; SHARMAN; TARBIN; GIBSON *et al.*, 2007).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) possui documentos próprios, como a RDC N°53 de 2012, que incorpora o regulamento internacional do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) e também considera as normas do *Codex Alimentarius*. Mais recentemente, a ANVISA instituiu a IN°51 de 2019. Ambos regulamentos estabelecem os LMRs de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, e a RDC N°53, entre outros assuntos, trata das metodologias analíticas indicadas para detecção dos resíduos em matrizes de origem animal, com a exceção do leite (BRASIL, 2012; 2019).

A determinação das metodologias analíticas para a detecção de antibióticos, em especial para o leite, pode ser definida então pelos laboratórios oficiais como o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN). Em relação aos métodos de triagem, vários kits analíticos de detecção de resíduos de antibióticos foram aprovados e são autorizados pelo MAPA, utilizando diferentes princípios de ação e detecção, como o *Charm Test*TM, um teste microbiológico comercial (NERO; MATTOS; BELOTI; BARROS *et al.*, 2007).

A fiscalização em si, no Brasil, é promovida pelo Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet), definido pela Resolução RDC N°253 de 2003 com o objetivo de controlar e fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Inicialmente, a matriz de análise foi leite bovino, posteriormente também foi analisado, entre outras matrizes, o leite integral em pó (BRASIL, 2003).

3.5 REVISÃO SISTEMÁTICA

A revisão sistemática, também conhecida como síntese de evidências, visa fornecer uma síntese abrangente e imparcial a partir de estudos relevantes sobre um assunto em um único documento. Embora tenha muitas das características de uma revisão de literatura, aderindo ao princípio geral de resumir o conhecimento de um corpo de literatura, uma revisão sistemática difere na medida em que tenta incluir todas as evidências relevantes para uma pergunta e se concentrar em pesquisas que relatam dados em vez de conceitos ou teoria. A maneira como as revisões sistemáticas são conduzidas pode variar, mas de forma geral são realizadas de acordo com guias de organizações especializadas no tema como a *Cochrane*, ou o *Joanna Briggs Institute*, que inclui diferentes desenhos de estudo e evidências derivadas de diferentes fontes em suas revisões sistemáticas (AROMATARIS; PEARSON, 2014).

Frequentemente, as revisões sistemáticas, originalmente voltadas a estudos clínicos, incluem um componente de meta-análise, que envolve o uso de técnicas e ferramentas estatísticas para sintetizar os dados de vários estudos em uma única estimativa quantitativa. Ao final de uma revisão sistemática, se não for possível formar uma estimativa conjunta, ela pode ser publicada sem avançar para uma meta-análise,

no entanto, se for possível, é interessante que essa técnica seja aplicada. Existem no geral oito estágios para realização da revisão sistemática, são estes: 1) a formulação da pergunta do estudo; 2) a definição dos critérios de inclusão e exclusão; 3) o desenvolvimento da estratégia de busca e localização dos estudos; 4) a seleção dos estudos; 5) a extração dos dados; 6) a avaliação da qualidade dos estudos; 7) a análise e interpretação dos dados; e por fim 8) a divulgação dos resultados (AHN; KANG, 2018; UMAN, 2011). Aqui, no entanto, por se tratar de uma adaptação de revisão sistemática com a extrapolação para estudos analíticos, algumas condições podem não se aplicar, como é o caso da meta-análise e a avaliação da qualidade dos estudos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento do estudo foi elaborado de acordo com as recomendações do manual do *Joanna Briggs Institute* (JBI) intitulado “*JBI manual for evidence synthesis*” (AROMATARIS; MUNN, 2020). A Figura 1 apresenta o resumo das etapas do desenvolvimento da revisão sistemática:

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS PARA CONDUÇÃO DA REVISÃO SISTEMÁTICA



FONTE: A autora (2021).

A pergunta a ser respondida pelo estudo foi: quais são os métodos analíticos disponíveis na literatura desenvolvidos e validados para detectar os resíduos de antibióticos no leite de origem animal e derivados com emprego da nanotecnologia? A partir dessa pergunta foram estabelecidos os critérios de inclusão e exclusão. O protocolo do estudo foi registrado na plataforma PROSPERO e publicado sob registro CRD42021261675.

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os estudos que apresentaram métodos analíticos para detecção e/ou quantificação de quaisquer classes de antibióticos em leite de origem

animal e/ou derivados, e nos quais fosse verificado o prefixo “nano” no título e/ou resumo indicando o emprego de nanotecnologia.

Na etapa de elegibilidade, o critério de “dados” foi adicionado para que os artigos estivessem alinhados com as exigências de validação de métodos analíticos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Foram exigidos dados de limite de detecção (LD), porcentagem de recuperação, faixa de linearidade e precisão (com ensaio de repetitividade e reprodutibilidade), escolhidos por serem numericamente detectáveis durante a leitura na íntegra.

4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos estudos publicados em caracteres não romanos; artigos de revisão, anais de conferências, resumos de congresso, relatórios de agências e capítulos de livros; estudos que compararam técnicas analíticas existentes e validadas por outros estudos.

4.3 LOCALIZAÇÃO DOS ESTUDOS

As buscas foram realizadas nas bases de dados Pubmed, Web of Science e Scopus. Para desenvolver a estratégia de busca foram utilizados três grupos de descritores, o primeiro grupo relacionado a antibióticos e seus sinônimos, o segundo com palavras relacionadas a metodologias analíticas, e por fim um grupo com as matrizes a serem analisadas, no caso o leite e seus derivados.

Os grupos de descritores foram adaptados para cada base de dados e foram combinados por meio do operador booleano “AND”, e entre cada um dos termos pertencentes ao mesmo grupo foi utilizado o operador booleano “OR”. A estratégia de busca completa para cada base de dados está disponível no APÊNDICE 1. Na base de dados Scopus foi realizada a busca adicional “index(medline)” com a combinação do operador booleano “AND NOT” para que fossem retiradas previamente as duplicatas da base de dados MEDLINE.

4.4 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Após a busca nas bases de dados listadas anteriormente, as referências foram compiladas com o auxílio do software EndNote X7® e as duplicatas foram excluídas. A partir das informações compiladas foi elaborada a montagem da tabela de inclusão no Microsoft Office Excel® e a transferência dos títulos e resumos para um documento no Microsoft Office Word®. Dois revisores independentes realizaram a triagem inicial dos artigos (leitura de títulos e resumos), com base nos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos.

Ao fim da triagem, os resultados foram confrontados e uma reunião para consenso foi realizada. No caso de discordância em relação a inclusão ou exclusão dos artigos, um terceiro revisor foi consultado. Os artigos selecionados nesta fase foram lidos na íntegra pelos dois revisores e avaliados novamente quanto aos critérios de inclusão e exclusão. Após novo consenso, os artigos eleitos tiveram seus dados coletados.

4.5 EXTRAÇÃO DOS DADOS

Os dados dos artigos foram extraídos pelos dois revisores e organizados em tabelas no Microsoft Office Excel®. Após, os resultados foram confrontados em reunião de consenso e em casos de discordância o terceiro revisor foi acionado. Foram coletados os dados gerais do estudo (data de publicação, técnica analítica, analitos, matriz, aplicação nanotecnológica e local do estudo), características específicas de cada metodologia e os dados da validação. As tabelas elaboradas para a extração são apresentadas no APÊNDICE 2.

4.6 SÍNTESE DOS RESULTADOS

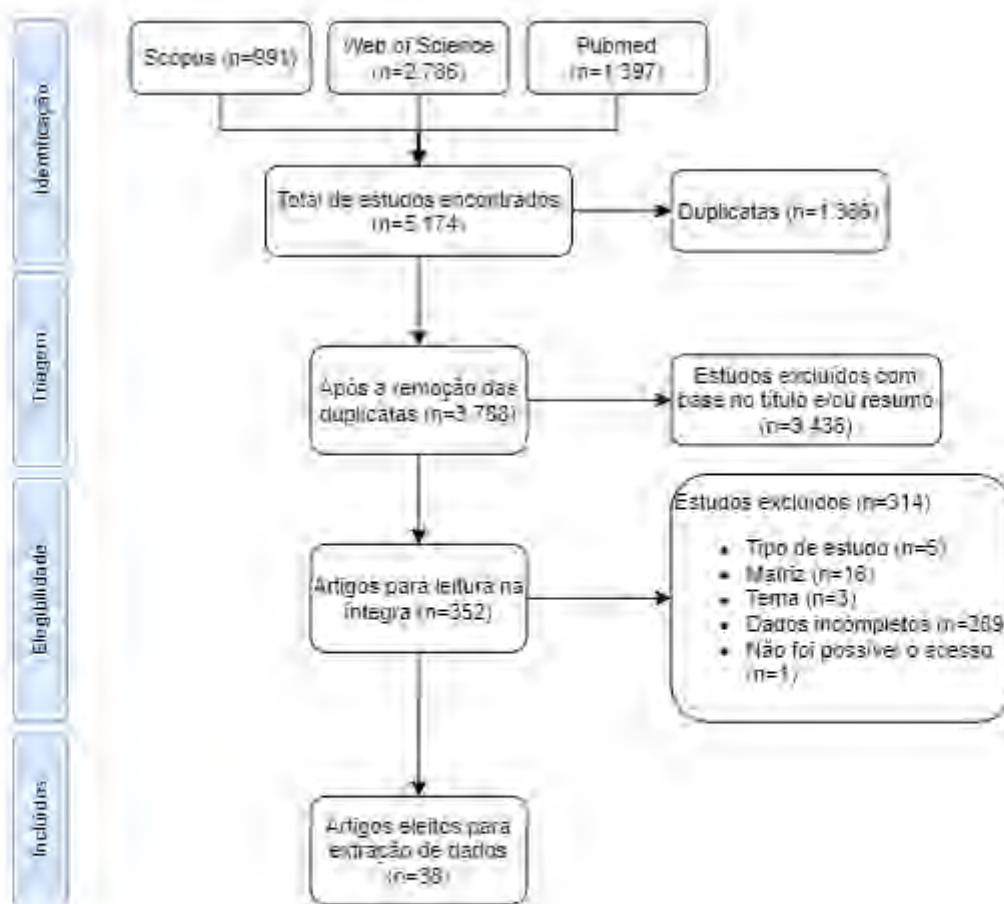
Os resultados foram apresentados de forma descritiva com o auxílio de gráficos e tabelas e discutidos de maneira a identificar os analitos, as técnicas de análise e as aplicações nanotecnológicas, e também avaliar a frequência desses aspectos. Além disso, avaliar como os parâmetros de validação foram realizados e apresentados e se estão de acordo com o preconizado pelos guias de validação de metodologias analíticas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Um total de 5.174 estudos foram encontrados nas bases de dados utilizando as estratégias de busca conforme descrito no APÊNDICE 1. Desses estudos, 1.397 foram recuperados no Pubmed, 991 no Scopus e 2.786 no Web of Science. Foram identificadas 1.386 referências duplicadas, restando um total de 3.788 artigos para a etapa de triagem. Após a leitura de títulos e resumos deste total de artigos foi realizada reunião de consenso entre os dois revisores, e um total de 352 artigos foram selecionados para a leitura na íntegra. Na etapa de elegibilidade, 38 estudos (APÊNDICE 2) foram eleitos para a etapa de extração de dados utilizando as tabelas apresentadas no APÊNDICE 3. A Figura 2 descreve os passos para a seleção dos estudos e o número (n) de estudos resultante de cada um dos processos.

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO PROCESSO DE SELEÇÃO DOS ARTIGOS



FONTE: A autora (2021).

5.2 ESTUDOS EXCLUÍDOS

Foi estabelecido para a etapa de elegibilidade que fossem identificados obrigatoriamente nos artigos ao menos quatro dos sete parâmetros de validação que podem ser encontrados no manual de garantia de qualidade analítica do MAPA, mas que também são encontrados nos manuais internacionais como os guias de validação do FDA e UE (BRASIL, 2011; EU, 2002; FDA, 2019). Esses parâmetros foram o limite de detecção (LD) ($\mu\text{g/kg}$), a recuperação (%), a faixa de linearidade ($\mu\text{g/kg}$) e a precisão (com ensaio de repetitividade e reprodutibilidade) (%RSD), escolhidos por apresentarem resultados numéricos identificáveis ao longo da leitura. Essa estratégia foi utilizada pela falta de padrão entre os artigos, em que aqueles que relataram ter realizado uma validação da metodologia analítica muitas vezes não apresentava quaisquer ou muito pouco dos dados relacionados aos parâmetros de validação, mesmo daqueles estabelecidos por manuais internacionais, enquanto outros artigos que realizaram os ensaios que descrevem os parâmetros de validação, não mencionaram a palavra validação e/ou qualquer variação da mesma. Por meio desse critério, 289 estudos foram excluídos.

Outras razões para a exclusão de artigos ao longo da leitura na íntegra foram: o tipo de publicação (5 estudos), dos quais dois tratavam-se de capítulos de livro, outros dois foram publicações de anais de conferência e um estudo foi escrito no formato *short communication*; a matriz utilizada (16 estudos), ou seja, não utilizaram leite de origem animal e/ou produtos derivados para testarem seus respectivos métodos analíticos; o tema (3 estudos), em que dois dos artigos tratavam da análise de um pesticida no leite e não da detecção de antibióticos, e um desses três tinha como objetivo otimizar parâmetros de metodologias desenvolvidas em outros estudos anteriores. Por fim, um dos artigos selecionados não foi encontrado para leitura na íntegra mesmo após o contato com os autores da publicação.

5.3 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

5.3.1 Local de origem

Autores de nove países participaram das 38 publicações incluídas no presente estudo. Destas, 62,5% foram produzidas em instituições localizadas na China; 22,5% produzidas em instituições do Irã; e outros países tiveram participação em uma publicação cada (Estados Unidos, Turquia, Itália, Malásia, Japão, Índia e Espanha), sendo que dois estudos tiveram instituições de dois países envolvidas, China e Estados Unidos, Malásia e Japão.

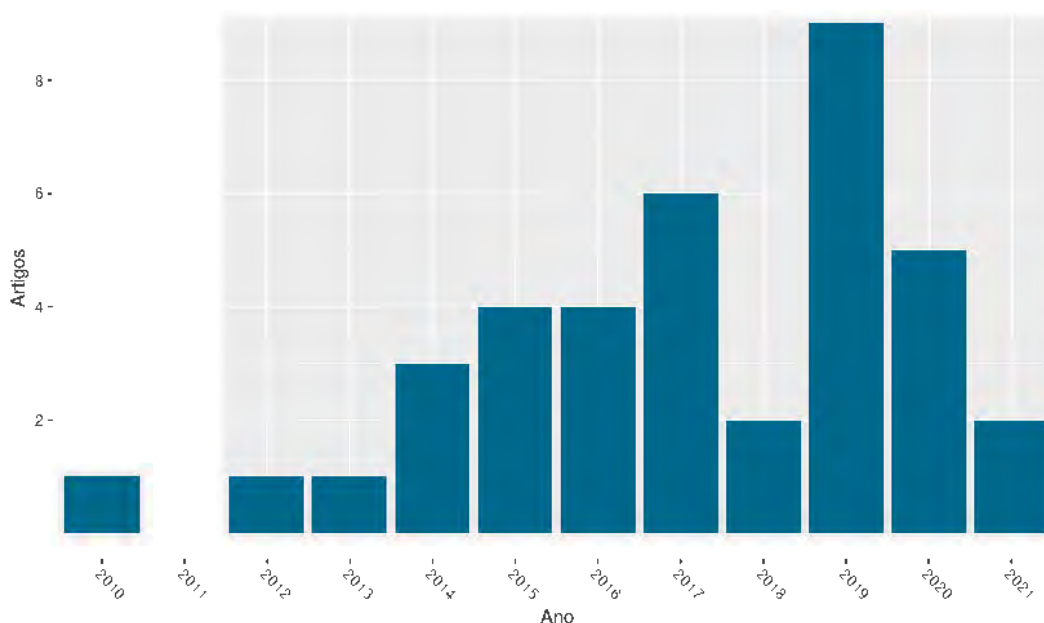
O número alto de publicações produzidas em instituições chinesas acompanha o fato de que a China é líder mundial em publicações científicas (MCCARTHY, 2019). Já as publicações produzidas no Irã podem refletir a preocupação da comunidade científica em relação ao uso de antibióticos em animais produtores de leite daquele país. No Irã, são consumidas cerca de 806 toneladas de antibióticos por ano, sendo 64% dessa quantidade destinada ao uso veterinário na indústria pecuária. Ainda, um estudo realizado em 2013 em Isfahan, no Irã, demonstrou que 19,8% das amostras de leite analisadas tinham níveis de resíduos de antibióticos maiores do que o padrão europeu. Outro estudo em um país vizinho, o Kuwait, revelou que 37% das amostras de leite cru e 7% das amostras de leite pasteurizado continham resíduos de antibióticos acima do limite considerado padrão aceitável (ALIMOHAMMADI; ASKARI; AZGHADI; TAGHAVIMANESH *et al.*, 2020).

5.3.2 Ano de publicação

O primeiro artigo a ser publicado dentre os estudos eleitos foi publicado no ano de 2010, e o ano com mais publicações (9 artigos) foi o ano de 2019. Ao longo dos anos, desde o primeiro artigo, as publicações por ano de metodologias analíticas validadas para detecção de antibióticos no leite com aplicações nanotecnológicas tiveram em boa parte desse período a tendência em aumentar, com exceção de alguns anos como 2011 e 2018, que tiveram uma e quatro publicações a menos que o ano anterior, respectivamente (Figura 3). O ano de 2020 também apresentou uma queda em relação ao ano anterior, nesse caso, como possível explicação estudos apontam que as consequências da pandemia gerada pela COVID-19 afetaram fortemente o meio científico e consequentemente a produção científica em algumas áreas. Outra explicação para o menor número de publicação em 2020 é o atraso que pode ocorrer na indexação os estudos nas bases de dados. Por último, o ano de 2021

apresentou menos artigos que o ano de 2020, aqui, em decorrência do atual estudo ter sido iniciado ainda no primeiro semestre do mesmo ano, não sendo possível definir quantos artigos serão publicados sobre o tema até o final de 2021, podendo, nesse caso, ainda apresentar um crescimento em relação ao ano anterior (GIUSTINI; SCHROEDER; AXELROD, 2021; SLOANE; ZIMMERMAN, 2021).

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS ARTIGOS INCLUÍDOS POR ANO DE PUBLICAÇÃO



FONTE: A autora (2021).

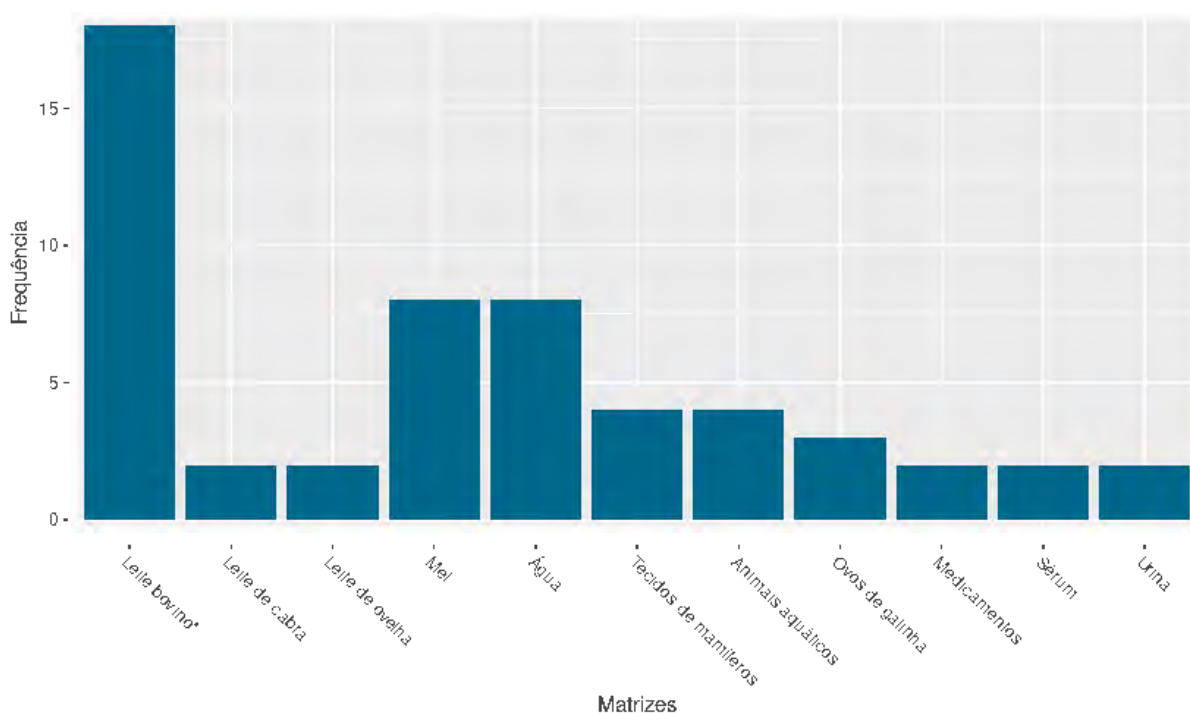
5.3.3 Matrizes analisadas

Em relação às matrizes utilizadas em cada estudo, todos os artigos utilizaram pelo menos leite bovino como matriz. Dos 38 estudos, 18 utilizaram apenas leite bovino como matriz; dois estudos utilizaram além do leite bovino o leite de cabra e o leite de ovelha na mesma publicação; nenhum estudo utilizou como matriz algum produto derivado do leite. Outras matrizes, que não foram consideradas nos dados de validação, também foram utilizadas, tais quais: mel (8 artigos); água, potável e de rios (8 artigos); tecidos de animais mamíferos (4 artigos); tecidos de animais aquáticos (4 artigos); ovos de galinha (3 artigos); medicamentos comerciais (2 artigos); sêrum e urina humana (2 artigos). Esses dados estão representados na Figura 4.

Nos documentos oficiais, nacionais e internacionais, os produtos derivados do leite foram encontrados como possíveis matrizes apenas no guia do FDA, em que são

considerados os queijos de leite bovino e caprino, o iogurte e o creme de leite (FDA, 2019). Somado a isso, quanto maior a heterogeneidade da matriz alimentar, maiores são as complexidades para o aumento da sensibilidade dos métodos (MANIMEKALAI; RAWSON; SENGAR; KUMAR, 2019). Esses fatores podem explicar a preferência dos estudos pela utilização das matrizes alimentares complexas mais primárias, como o leite cru.

FIGURA 4 - MATRIZES UTILIZADAS PARA A DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR MEIO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DESENVOLVIDOS



FONTE: A autora (2021).

NOTA: * Estudos que utilizaram apenas leite bovino.

5.3.4 Analitos

Um total de 62 moléculas de antibióticos diferentes foram utilizadas como analitos nas metodologias analíticas desenvolvidas pelos estudos incluídos. Essas moléculas podem ser classificadas em oito classes distintas de antibióticos, são estas: a classe dos aminoglicosídeos (3 antibióticos), das tetraciclina (8 antibióticos), dos anfenicois (3 antibióticos), das fluoroquinolonas (12 antibióticos), dos macrolídeos (1 antibiótico), dos beta-lactâmicos (5 antibióticos), das sulfonamidas (21 antibióticos) e

das cefalosporinas (9 antibióticos). A frequência com que cada antibiótico apareceu nos artigos eleitos sendo utilizados como analitos está distribuída na Figura 5.

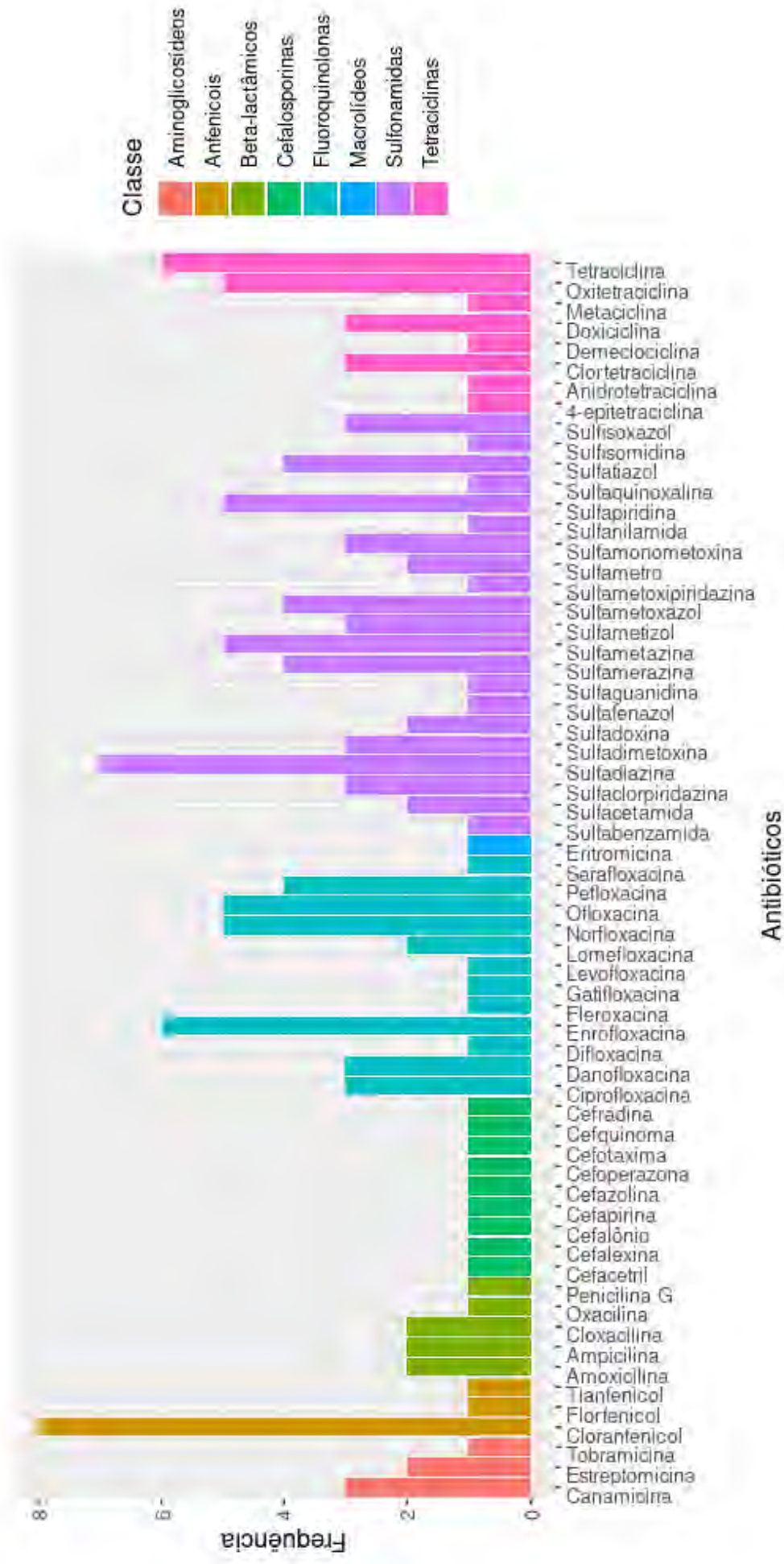
O antibiótico analisado com maior frequência pelos estudos foi o cloranfenicol (n=8), na maioria dos casos com o emprego de metodologias seletivas para esse fármaco. O cloranfenicol é um antibiótico que não deve ser encontrado em nenhuma concentração nos alimentos de origem animal, isso porque seu uso em animais produtores de alimentos é proibido. Como discutido anteriormente, ele apresenta uma estreita margem de segurança e seus efeitos adversos podem ser graves, como a anemia aplástica descrita em humanos (KIVITS; BROERS; BEELTJE; VAN VLIET *et al.*, 2018; PAPICH, 2020). Logo, metodologias que consigam detectar concentrações ainda que muito baixas de resíduos de cloranfenicol no leite são de grande importância para o monitoramento desse alimento.

O segundo antibiótico mais abordado pelos estudos selecionados foi a sulfadiazina (n=7), uma representante da classe das sulfonamidas, que é um dos grupos mais antigos de antibióticos, utilizado há mais de 60 anos em animais de produção. Não por acaso, essa foi a classe de antibióticos mais frequente nos estudos. Junto com as penicilinas e as tetraciclina, as sulfonamidas compuseram 70% dos antibióticos comercializados em 30 países europeus em 2016, segundo a *European Surveillance Agency on Veterinary Antimicrobial Consumption* (ESVAC) (TOPI; SPAHIU, 2020). Além de serem utilizadas de forma recorrente em animais produtores de alimentos, as sulfonamidas apresentam como característica a estabilidade em altas temperaturas, por isso a preocupação em identificar esses resíduos principalmente no leite, em que as sulfonamidas podem ser encontradas mesmo após os processos de pasteurização e processamento UHT (ROCA; ALTHAUS; MOLINA, 2013).

A tetraciclina e a enrofloxacin compõem a terceira posição entre os antibióticos mais frequentes nos estudos analisados (n=6). Como mencionado anteriormente, as tetraciclina são, assim como as sulfonamidas, antibióticos amplamente utilizados na pecuária. Como consequência, seus resíduos são encontrados com frequência em leite bovino. A preocupação em torno dos resíduos de tetraciclina nos alimentos envolve os possíveis efeitos adversos como reações alérgicas, mas um evento preocupante específico é desencadeado por esses antibióticos quando o leite adulterado é consumido por bebês ou crianças menores de 12 anos, que é a descoloração dos dentes primários e permanentes por afetar o

esmalte dentário dessa população (AALIPOUR; MIRLOHI; JALALI; AZADBAKHT, 2015). A enrofloxacin faz parte das fluoroquinilonas, grupo de antibióticos também encontrado com frequência no leite bovino. A enrofloxacin foi desenvolvida para o uso exclusivo veterinário, mas um dos primeiros produtos de degradação dessa substância é a ciprofloxacina, outra representante da classe, que por sua vez é utilizada em humanos. Dessa forma, a preocupação em relação aos possíveis efeitos tóxicos e ao surgimento de resistência em decorrência de resíduos desse antibiótico nos alimentos fica ainda mais acentuada (EBERT; BACHMANN; KÜHNEN; KÜSTER *et al.*, 2011; POLVEIRO; VIDIGAL; MENDES; YAMATOIGI *et al.*, 2020; SACHI; FERDOUS; SIKDER; HUSSANI, 2019).

FIGURA 5 - FREQUÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS COMO ANALITOS NOS ARTIGOS INCLuíDOS



FONTE: A autora (2021).

5.3.5 Técnicas analíticas e aplicações nanotecnológicas

As técnicas analíticas mais empregadas pelo conjunto de estudos incluídos na revisão sistemática foram as cromatografias líquidas de alta e ultra eficiência (CLAE/CLUE), sendo que 15 artigos utilizaram a primeira e cinco artigos utilizaram a segunda. A CLUE desenvolveu-se a partir da introdução da fase estacionária com partículas porosas de tamanho menor ou igual a 2 μm , com o intuito de gerar separações mais rápidas e eficientes que a CLAE. Os princípios de separação são os mesmos para as duas técnicas, mas as principais diferenças estão nas colunas empregadas, que apresentam dimensões reduzidas na CLUE, além do preenchimento com partículas $\leq 2 \mu\text{m}$. Esses aspectos somados à alta velocidade pela qual a fase móvel percorre a coluna, aumentam a resolução e a detectabilidade, e diminuem o tempo das análises. No entanto, algumas desvantagens ainda dificultam a ampla utilização da CLUE em relação à CLAE, como o custo mais elevado do equipamento, a exigência de maiores cuidados com a limpeza das amostras e os problemas decorrentes do emprego de pressões elevadas que diminuem a vida útil das colunas, o que pode explicar porque a CLAE ainda é empregada com mais frequência que a CLUE (MALDANER; SALES; JARDIM, 2012; SWETHA SRI; BHAVYA SRI; MOUNIKA, 2020). Outras técnicas cromatográficas utilizadas foram a nano cromatografia líquida (Nano-LC) e a cromatografia de íons (IC), ambas variações da cromatografia líquida, que se diferenciam principalmente pelas características das colunas que participam do instrumento analítico. Na Nano-LC, as colunas têm diâmetros internos muito reduzidos em comparação com a CLAE e o fluxo ocorre em taxas de nanolitros por minuto, mas as dificuldades em empregar essa técnica são similares às aquelas relacionadas à CLUE (GAMA; COLLINS; BOTTOLI, 2013). Já na IC utiliza-se colunas preenchidas de resinas de troca iônica para separar íons atômicos ou moleculares com base na sua interação com a resina. Contudo, não é muito comum esse tipo de técnica para análise de antibióticos devido à necessidade de transformação do analito, como foi realizado por Muhammad *et al.* (2018) (WORDEN, 2005).

Outras três técnicas distintas apareceram nos artigos incluídos por três vezes cada. Foram elas a espectroscopia de fluorescência, a colorimetria e a voltametria de onda quadrada. Em relação às duas primeiras técnicas, é possível observar que as

propriedades ópticas melhoradas das nanopartículas e nanoestruturas, de modo geral em relação aos mesmos materiais em escala convencional, são atrativas e podem ser empregadas com sucesso no desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de moléculas de antibióticos em alimentos (KUMBHAKAR; RAY; STEPANOV, 2014). A utilização da voltametria de onda quadrada revela como as técnicas eletroquímicas vêm crescendo no campo das análises químicas, já que elas apresentam vantagens interessantes quando comparadas com as técnicas analíticas mais utilizadas, como a CLAE. Podem ser mencionadas sua alta sensibilidade, baixo custo de instrumentação e tempo de resposta relativamente rápido (BITEW; AMARE, 2020).

A ferramenta analítica microbalança de cristal de quartzo (QCM) é um tipo de biossensor que é extremamente sensível a mudanças nas propriedades físicas que ocorrem na sua superfície. Ele foi originalmente considerado como um dispositivo para medir a massa de filmes fixados na superfície do cristal de quartzo e, portanto, é chamado de microbalança (HARRIS; LAKSHMANAN; EFREMOV; KILLARD, 2017). Essa técnica foi encontrada em dois estudos incluídos, sendo que um deles utilizou uma variação recente dessa técnica, a nanobalança de cristal de quartzo (NECQ). Devido à sua simplicidade, conveniência e resposta em tempo real, essa técnica vem sendo considerado no campo das análises biomoleculares e pode ser uma opção interessante como método de triagem (BHAND; MISHRA, 2017).

Algumas técnicas apareceram apenas uma vez dentro do conjunto de artigos eleitos. Uma delas foi a técnica de *light scattering* (LS), com a qual os autores também buscaram explorar o potencial óptico de nanoestruturas, nesse caso o espalhamento de luz, para a detecção de antibióticos. Ainda, sobre as técnicas que exploraram o potencial de emissão de luz de nanomateriais, a quimioluminescência foi empregada por Hao *et al.* (2015) para detecção de cloranfenicol. Essa técnica se baseia na luminescência gerada por uma reação química entre diferentes materiais (BARNETT; FRANCIS, 2005). Apesar de imunoensaios serem realizados com frequência para detecção de antibióticos em alimentos, em especial o ELISA, apenas um artigo incluído apresentou uma técnica imunoquímica com emprego de nanotecnologia. Hu *et al.* (2015) apresentaram um imunoensaio de fluorescência (FIA) com nanopartículas como sondas fluorescentes (CHÁFER-PERICÁS; MAQUIEIRA; PUCHADES, 2010). Técnicas eletroanalíticas mais simples, como a utilização de eletrodo íon seletivo

(EIS), que pode ser aplicada em testes de campo, também foram observadas, sendo que nesse caso a utilização de estruturas nanométricas por Huang *et al.* (2019) foi essencial para que a técnica se tornasse alvo-seletiva. A espectroscopia de lente térmica (ELT) foi aplicada no estudo de Kazemi *et al.* (2016). Essa técnica se baseia na medição do gradiente térmico produzido pela absorção de um feixe de laser, e apesar de não ser tão popular na rotina laboratorial, por ser composta de instrumentos difíceis de serem operados e configurados, apresenta no geral boa sensibilidade para detecção de moléculas, em especial quando combinada a técnicas de separação como as cromatográficas (LIU; FRANKO, 2016).

As aplicações nanotecnológicas mais empregas nas metodologias analíticas estão relacionadas ao preparo de amostras, mais especificamente a extração em fase sólida (EFS) e suas variações com inúmeras possibilidades de preenchimentos e formas de eluição. Em 23 dos 38 artigos incluídos ($\approx 60\%$) esse tipo de preparo foi realizado com aplicações de nanoestruturas. A EFS é aplicada, principalmente, nas técnicas cromatográficas, mas aqui foi utilizada também antes da análise por espectroscopia de fluorescência e por espectroscopia de lente térmica (ELT). A extração em fase sólida magnética (MSPE) foi o tipo de EFS mais recorrente nos estudos, a MSPE se baseia na dispersão de um sorvente magnético em solução contendo os analitos com posterior aplicação de campo magnético externo para isolamento das partículas magnéticas com os analitos dispersos em sua superfície. O procedimento não precisa de etapas adicionais, como centrifugação, precipitação ou filtração da amostra, o que reduz a perda dos analitos. Os sorventes magnéticos têm uma grande influência na velocidade da separação, na seletividade e reprodutibilidade das metodologias baseadas em MSPE, e a utilização de nanopartículas e nanocompósitos tem possibilitado o melhoramento da técnica. Uma variedade de nanomateriais à base de sílica, à base de carbono, óxidos metálicos, estruturas metal-orgânicas (MOFs), polímeros orgânicos porosos, materiais mesoporosos e materiais molecularmente impressos (MIPs) e de acesso restrito já foram estudados e podem ser encontrados nos estudos incluídos nesta revisão sistemática (HU; HE; CHEN, 2020; IBARRA; RODRIGUEZ; GALÁN-VIDAL; CEPEDA *et al.*, 2015).

Como mencionado ao longo da discussão sobre as técnicas analíticas, muitas das aplicações nanotecnológicas encontradas nos estudos incluídos se basearam nas propriedades ópticas das nanopartículas e nanoestruturas para aplicações em

sensores e biossensores. Os aptasensores, que utilizam aptâmeros para o reconhecimento de elementos, podem ser formados por componentes eletroquímicos e ópticos. Aqueles compostos de DNA são em sua maioria robustos e podem ser sintetizados com alto grau de pureza e reprodutibilidade, permitindo mais facilmente os processos de fabricação de biossensores (DI PIETRANTONIO; CANNATÀ; BENETTI, 2019). Outro grupo de materiais encontrado em mais de um trabalho foi o de estruturas metalorgânicas (MOFs). Os MOFs têm se destacado por sua versatilidade estrutural e porosidade ajustável, e uma quantidade considerável de trabalhos que investigam MOFs como sensores é baseada na propriedade de fotoluminescência que esses materiais podem oferecer. A fim de adaptar essas estruturas para uma infinidade de aplicações potenciais, estudos recentes expandiram as vantagens do seu uso com a escala nanométrica, formando os chamados NanoMOFs (CHIDAMBARAM; STYLIANOU, 2018; MAJEWSKI; NOH; ISLAMOGLU; FARHA, 2018). Os polímeros molecularmente impressos (MIPs) também foram recorrentes nos estudos. Eles podem ser descritos como análogos sintéticos dos sistemas biológicos de antígeno-anticorpo. Assim como essas moléculas, eles operam por um mecanismo de reconhecimento em que o MIP se liga seletivamente à molécula com a qual foi modelada durante a sua produção, com a vantagem de não requererem condições ambientais especiais de armazenamento e poderem ser aplicados em uma faixa de temperatura muito mais ampla. Os MIPs podem formar membranas, filmes, micropartículas e nanopartículas. As nanoestruturas de MIP têm como grande vantagem a maior área de superfície por unidade de massa molecular do polímero que permite o maior acesso do analito (BELBRUNO, 2018; CANFAROTTA; CECCHINI; PILETSKY, 2018).

A Tabela 1 sumariza os analitos utilizados em cada um dos artigos da revisão sistemática, as técnicas analíticas utilizadas nas metodologias desenvolvidas e validadas, bem como as aplicações nanotecnológicas empregadas pelos estudos incluídos.

TABELA 1 - DADOS GERAIS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE CADA ESTUDO INCLUÍDO

Artigo	Analitos	Nanotecnologia (Aplicação)	Técnica Analítica
AMIRIPOUR <i>et al.</i> , 2021	Cloranfenicol	MIP/Zr-LMOF nanoestruturados (sensor de luminescência)	Espectroscopia de fluorescência
SERESHTI <i>et al.</i> , 2021	Oxitetraciclina, tetraciclina e doxiciclina	Nanocompósito de óxido de grafeno/polianilina (EC-MSPE)	CLAE-UV
DI <i>et al.</i> , 2020	Sulfadiazina, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfametizol, sulfaclorpiridazina e Sulfadimetoxina	Nanocompósito mesoporoso de carbono (MSPE)	CLUE-MS
LI <i>et al.</i> , 2020	Ofloxacina, pefloxacina, norfloxacina, enrofloxacina e gatifloxacina	Nanomateriais impressos em mídia de acesso restrito (DSPE)	CLAE-UV
SAHEBI <i>et al.</i> , 2020	Ampicilina, penicilina G, amoxicilina, oxacilina e cloxacilina	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ (D-μ-SPE)	CLUE-MS/MS
TAVASSOLI <i>et al.</i> , 2020	Eritromicina	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ revestidas de sílica e funcionalizadas com cetil (MSPE)	CLAE-MS/MS
ZHAO <i>et al.</i> , 2020	Sulfacetamida, sulfapiridina, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfisoxazol e sulfametazina	Nanocompósito magnético <i>core-shell</i> Fe ₃ O ₄ @MoS ₂ (MSPE)	CLAE-MS/MS
AQDA <i>et al.</i> , 2019	Amoxicilina, ampicilina e cloxacilina	Nanocompósito de óxido de grafeno/amido (μ-SPE)	CLAE-UV
HUANG <i>et al.</i> , 2019	Canamicina	Estruturas nano metal-orgânicas encapsulados com flúor e aptâmeros (fornecedores de sinal)	EIS
JIANG <i>et al.</i> , 2019	Norfloxacina, ciprofloxacina, pefloxacina, lomefloxacina, enrofloxacina e ofloxacina	“Tapetes” de nanofibra de polianilina sulfonada/poliacrilonitrila (μ-SPE)	CLUE-MS/MS
NASIR <i>et al.</i> , 2019	Sulfadiazina, sulfametazina, sulfamonometoxina e sulfametoxazol	Nanotubos de carbono magnético funcionalizados com tiol (M-μ-SPE)	CLAE-DAD
PENG <i>et al.</i> , 2019	Oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina	Materiais de impressão molecular baseados em nanocompósitos magnéticos (MSPE)	CLAE-UV
SADEGUI <i>et al.</i> , 2019	Sulfatiazol, sulfapiridina e Sulfadiazina	Polianilina nanoestruturada (EFS)	CLAE-UV
SAHEBI <i>et al.</i> , 2019	Cefalônio, cefquinoma, cefazolina, cefoperazona, cefapirina, cefalexina, cefacetil, cefradina e cefotaxima	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ funcionalizadas com líquido iônico à base de DABCO (D-μ-SPE)	CLUE-MS/MS

(CONTINUAÇÃO) TABELA 1 - DADOS GERAIS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE CADA ESTUDO INCLUÍDO

Artigo	Analitos	Nanotecnologia (Aplicação)	Técnica Analítica
XU <i>et al.</i> , 2019	Norfloxacina, pefloxacina, enrofloxacin, ofloxacina, levofloxacina, ciprofloxacina, fleroxacin e lomefloxacina	AuNPs (indicador por mudança de coloração)	Colorimetria
YU <i>et al.</i> , 2019	Ofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacin, sarafloxacina, difloxacina, pefloxacina e danofloxacina	Nanocompósito magnético Fe ₃ O ₄ @MCM-48 (MSPE)	CLAE-MS/MS
MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2018	Cloranfenicol	Nanopartículas porosas de SnO ₂ (μ-QuEChERS)	IC-FLD
WEI <i>et al.</i> , 2018	Tetraciclina	Nanoflocos de CoOOH (sonda óptica)	LS
CHU <i>et al.</i> , 2017	Cloranfenicol	Nanofibra de poliestireno-polivinilpirrolidona (PFSPE)	CLAE-UV
ERSHADI <i>et al.</i> , 2017	Enrofloxacin	AgNPs (aumentar a intensidade da fluorescência sensibilizada por térbio)	Espectroscopia de Fluorescência
LIU <i>et al.</i> , 2017	Cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol	Fibras de AuNPs funcionalizadas por aptâmeros (μ-SPE)	CLAE-UV
LUAN <i>et al.</i> , 2017	Cloranfenicol	AuNPs (aptasensor colorimétrico)	Colorimetria
LUAN <i>et al.</i> , 2017 ^b	Canamicina	PtNPs e nano catalisadores Fe-MIL-88NH ₂ (aptasensor colorimétrico)	Colorimetria
WEI <i>et al.</i> , 2017	4-epitetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina e anidrotetraciclina	Nanopartículas magnéticas de óxido de grafeno/nano ferro zero valente (MSPE)	CLAE-MS/MS
CHEN <i>et al.</i> , 2016	Oxitetraciclina e canamicina	Nanoestrutura metalorgânica (aptasensor eletroquímico)	SWV
KAZEMI <i>et al.</i> , 2016	Sulfadiazina	Grafeno funcionalizado com nanopartículas de Fe ₃ O ₄ (D-μ-SPE)	ELT
WANG <i>et al.</i> , 2016	Sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametizol, sulfamonometoxina, sulfametro, sulfaclopiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfisoxazol, sulfadimetoxina e sulfafenazol	Nanocompósito magnético Fe ₃ O ₄ @GO (MSPE)	CLAE-MS/MS
XU <i>et al.</i> , 2016	Tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, metaciclina e doxiciclina	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas grafitados com quitosana modificada (EFS)	CLUE-Q-TOF-MS

(CONCLUSÃO) TABELA 1 - DADOS GERAIS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE CADA ESTUDO INCLUÍDO

Artigo	Analitos	Nanotecnologia (Aplicação)	Técnica Analítica
HAO <i>et al.</i> , 2015	Cloranfenicol	Nanopartículas magnéticas de ferro Fe ₃ O ₄ funcionalizadas com AuNFs (aptasensor quimioluminescente)	Quimioluminescência
HU <i>et al.</i> , 2015	Norfloxacin	Nanopartículas com conversão ascendente (marcador)	FIA
MISHRA <i>et al.</i> , 2015	Estreptomicina	Nanobalança eletroquímica de cristal de quartzo (técnica)	NECQ
RUIZ-PALOMERO <i>et al.</i> , 2015	Danofloxacin	Nanocelulose modificada com β -ciclodextrina (μ -SPE)	Espectroscopia de Fluorescência
HE <i>et al.</i> , 2014	Ofloxacin, danofloxacin e enrofloxacin	Nanopartículas molecularmente impressas Fe ₃ O ₄ @MI-POSS (MSPE)	CLAE-UV
LIU <i>et al.</i> , 2014	Tetraciclina e cloranfenicol	Nanoclusters de sulfeto de metal conjugado com avidina-biotina (elementos de reconhecimento)	SWV
YOLA <i>et al.</i> , 2014	Tobramicina	Nanosensor de filme de poli (HEMA – MAGA) com impressão de tobramicina na superfície de ouro do chip QCM (sensor)	QCM
LIU <i>et al.</i> , 2013	Estreptomicina	Nanoesferas magnéticas de MIP (sensor)	SWV
D'ORAZIO <i>et al.</i> , 2012	Sulfabenzamida, sulfaclorpiridazina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametro, sulfametazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, sulfanilamida, sulfapiridina, sulfaquinoxalina, sulfisoxazol, sulfatiazol e sulfisomidina	Nano cromatografia líquida (técnica)	Nano-LC
LU <i>et al.</i> , 2010	Cloranfenicol	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (EFS)	CLAE-MS/MS

LEGENDA: CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência; CLUE- Cromatografia líquida de ultra eficiência; UV- Ultravioleta; MS- Espectrometria de massa; MS/MS- Espectrometria de massa em tandem; EIS-Eletrodo íon seletivo; DAD- Detector de arranjo de diodos; IC-FLD- Cromatografia de íons acoplada a detector de fluorescência; LS- *Light scattering*; SWV- Voltametria de onda quadrada; ELT- Espectroscopia de lente térmica; Q-TOF- Quadrupolo e Tempo de

Voo; FIA- Imunoensaio de fluorescência; NECQ- Nanobalança eletroquímica de cristal de quartzo; QCM- Microbalança de cristal de quartzo; Nano-LC- Nano cromatografia líquida; MIP/Zr-LMOF- Polímero molecularmente impresso revestido em estrutura metalorgânica de zircônio luminescente; EC-MSPE- Extração em fase sólida controlada eletroquimicamente; MSPE- Extração em fase sólida magnética; DSPE- Extração em fase sólida dispersiva; D- μ -SPE- Microextração em fase sólida dispersiva; μ -SPE- Microextração em fase sólida; M- μ -SPE- Microextração em fase sólida magnética; DABCO- 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane; AuNPs- Nanopartículas de ouro; μ -QuEChERS- Microextração em fase sólida "rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura"; PFSPE- Extração de fase sólida de nanofibra empacotada; AgNPs- Nanopartículas de prata; PtNPs- Nanopartículas de platina; EFS- Extração em fase sólida AuNFs- Nanoestruturas de ouro funcionalizadas em forma de flor.
FONTE: A autora (2021).

5.4 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Os estudos incluídos obrigatoriamente apresentaram os critérios de validação estabelecidos no momento da inclusão em decorrência das divergências descritas no item 5.2. No entanto, foram verificados quais artigos mencionaram o desenvolvimento da etapa de validação, e se mencionaram, quais guias utilizaram. Dos 38 artigos incluídos na revisão sistemática, 30 relataram ter validado a metodologia proposta, mas desses apenas cinco mencionaram ter utilizado um guia de validação como referência. Os cinco artigos tiveram como guia a *European Commission Decision 2002/657/EC*. Ainda, os autores de um dos cinco artigos mencionaram também ter utilizado o *Food and Drug Administration (FDA) guidance*. Um total de oito estudos não mencionaram a validação mesmo tendo abordado aspectos que são considerados na validação de um método analítico.

Os parâmetros buscados dentro dos artigos incluídos no momento de extração dos dados e que serão avaliados a seguir foram: a seletividade, o limite de detecção e limite de quantificação, a linearidade, a precisão, a recuperação, o efeito matriz e a robustez. Esses parâmetros podem ser encontrados no “Manual de garantia de qualidade analítica – Resíduos e contaminantes em alimentos” do MAPA, mas também podem ser encontrados com algumas variações em outros manuais e guias internacionais como o “*European Commission Decision 2002/657/EC*” na União Europeia e o “*Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products*” do FDA (BRASIL, 2011; EU, 2002; FDA, 2019).

5.4.1 Seletividade

A seletividade é tratada na maioria dos estudos relacionados à validação de metodologias analíticas de forma bastante conceitual e que pode ser avaliada com diferentes abordagens. Mesmo quando valores numéricos são obtidos nos ensaios que avaliam esse critério, o que conclui se o método é seletivo, normalmente, não é um limite numérico bem estabelecido por documentos legislativos ou guias laboratoriais. Por exemplo, quase sempre os autores avaliam criticamente os resultados obtidos e decidem conceitualmente o grau de seletividade (bom, ruim ou mediano) da metodologia analítica desenvolvida (ARAUJO, 2009).

Dos 38 estudos eleitos, 14 não mencionaram a seletividade. Não foram considerados os dados relacionados com a seletividade dos estudos que não deixaram explícita a intenção de abordar esse parâmetro. Dos 24 estudos que mencionaram a seletividade, quatro concluíram que o método era seletivo, mas não deixaram claro como chegaram a essa conclusão. Entre os 20 artigos que abordaram esse aspecto da validação e descreveram como foram realizados os procedimentos, diferentes abordagens foram descritas.

A abordagem mais utilizada foi fortificar voluntariamente amostras com antibióticos diferentes e com outros elementos, como íons metálicos e aminoácidos, que podem contaminar uma amostra de rotina. Cinco artigos reproduziram essa forma de determinar a seletividade e todos os autores concluíram que os seus respectivos métodos eram seletivos. Essa é a abordagem indicada pelo manual do MAPA, e já os guias do FDA e da UE não estabelecem como deve ser realizada a avaliação da seletividade.

A segunda abordagem mais utilizada foi fortificar amostras com antibióticos de outras classes, com um total de quatro artigos em que foram realizados ensaios de seletividade dessa forma e seus autores concluíram que as metodologias desenvolvidas eram suficientemente seletivas, com exceção de Liu *et al.* (2013), que perceberam um certo bloqueio no sinal do analito (estreptomicina) por outros antibióticos.

Três artigos fortificaram amostras com antibióticos homólogos (mesma classe) e também com antibióticos de outras classes para avaliar a seletividade. Os três concluíram que os métodos apresentados foram seletivos. Um desses artigos calculou o coeficiente de seletividade (k) relacionado ao sorvente da etapa de extração, calculado pela razão entre o coeficiente de distribuição (estabelecido por uma equação que avalia a capacidade de ligação do sorvente) do analito e dos outros antibióticos, sendo que nesse caso quanto maiores os valores de k mais seletivo é o método de extração.

A avaliação da matriz em branco para verificação de picos interferentes que pudessem alterar a análise do pico do(s) analito(s) foi realizada em dois estudos. Ambos utilizaram a técnica de CLAE e não identificaram possíveis interferentes, concluindo que o método era seletivo para aqueles analitos nas matrizes analisadas. Essa abordagem em relação a seletividade é comum para métodos cromatográficos,

mas nem sempre é possível obter a matriz isenta da substância de interesse (RIBANI; BEATRIZ; BOTTOLI; COLLINS *et al.*, 2004).

Ainda, dois artigos avaliaram a seletividade fortificando amostras apenas com homólogos dos analitos utilizados. Os autores dos dois artigos concluíram que as metodologias apresentaram seletividade. Um desses estudos também realizou o cálculo para determinar o coeficiente k , muito similar ao estudo mencionado anteriormente, mas nesse caso foi avaliada a capacidade de ligação do nanosensor produzido para aplicação na técnica de QCM.

Por fim, quatro artigos utilizaram abordagens distintas entre si para avaliar a sensibilidade da metodologia proposta. Foram elas: comparação dos resultados com outros estudos; investigação das fases estacionárias em experimentos preliminares e utilização daquela eleita seletiva; investigação de quaisquer picos interferentes no tempo de retenção do analito; e um deles fortificou amostras com o metabólito do analito.

5.4.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Segundo o guia de validação do MAPA para validação de metodologias analíticas que utilizam matrizes animais, os Limites de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$) são necessários, exceto para o leite. O guia ainda menciona que o LD possui definição equivalente à $CC\beta$. Apesar disso, os parâmetros de LD e LQ são os mais apresentados nos artigos e são mencionados pelo guia de validação do FDA. Dessa forma, eles foram inclusos para fins de confronto com os limites mínimos residuais (LMRs) estabelecidos. Na Tabela 2 os limites de detecção e de quantificação foram apresentados com os seus respectivos analitos, bem como a faixa de linearidade e o coeficiente de determinação que serão discutidos posteriormente. Para que os valores estivessem todos com a mesma unidade possibilitando a comparação direta, alguns valores foram convertidos de outras unidades para $\mu\text{g/kg}$.

Dos 62 antibióticos apresentados pelos artigos analisados, os LMRs de 39 dessas moléculas foram encontrados na IN° 51 de 2019; outras três foram classificadas como proibidas, sendo estas o cloranfenicol, a difloxacina e o florfenicol.

Apenas dois artigos apresentaram um LD e/ou LQ de antibióticos menores que seus respectivos LMRs. Wei *et al.* (2018) encontrou um LD de 102 $\mu\text{g/kg}$ para

tetraciclina utilizando a técnica analítica de *Light Scattering* (LS). O LMR estabelecido para essa substância segundo a IN° 51 é de 100 µg/kg, sendo que o mesmo valor é estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, órgão responsável por estabelecer os parâmetros alimentares internacionais. Considerando que outros estudos da revisão sistemática conseguiram um valor de LD e LQ muito abaixo para o mesmo antibiótico, é possível afirmar que essa metodologia não é a melhor para esse antibiótico quando comparada às outras observadas, e que é importante otimizá-la mesmo para ser considerada como método de triagem. He *et al.* (2014) estabeleceram um LD e um LQ de 12,42 e 41,38 µg/kg respectivamente para a danofloxacin. O LMR para esse antibiótico é de 30 µg/kg segundo a IN° 51 e o documento do *Codex Alimentarius*. Esse estudo utilizou a técnica de CLAE-UV, e por se tratar de uma técnica analítica normalmente aplicada como método confirmatório, o LQ acima do LMR deixa a metodologia desenvolvida pouco recomendada para esse antibiótico. Outros estudos apresentaram LQ muito abaixo da LMR para essa substância. Yu *et al.* (2019) apresentaram um LD e um LQ de 0,6 e 2,0 µg/kg para danofloxacin utilizando CLAE-MS/MS como técnica analítica (BRASIL, 2019; FAO, 2018).

Para os antibióticos mais analisados pelos estudos foram destacados os estudos com menores LDs e LQs. Para o cloranfenicol Lu *et al.* (2010) apresentaram um LD e um LQ de 0,003 e 0,008 µg/kg, respectivamente, utilizando como técnica analítica a CLAE-MS/MS em conjunto com a EFS. Di *et al.* (2020), ao aplicarem a metodologia desenvolvida para a sulfadiazina, estabeleceram um LD e um LQ de 0,014 e 0,045 µg/kg. Nesse estudo foi utilizada a CLUE-MS como técnica analítica em conjunto com a MSPE. Já Liu *et al.* (2014) encontraram um LD e um LQ de 0,007 e 0,025 µg/kg ao aplicar a metodologia do estudo para tetraciclina, sendo nesse caso a técnica utilizada foi de SWV. Por fim, para análise de enrofloxacin, o estudo que apresentou menores valores de LD e LQ para esse antibiótico foi realizado por Jiang *et al.* (2019) com valores de 0,02 e 0,08 µg/kg respectivamente. Esse estudo também utilizou como técnica analítica a CLUE-MS e a µ-SPE para a extração do analito.

TABELA 2 - LIMITES DE DETECÇÃO, LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E FAIXA DE LINEARIDADE DOS ANTIBIÓTICOS

Artigo	Veículo (*)	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)	Faixa de linearidade (µg/kg) (R ²)
AMIRIPOUR <i>et al.</i> , 2021	Leite	CAP 0,11	-	0,16 - 161,56 (0,999)
SERESHTI <i>et al.</i> , 2021	Leite	OTC 4,73; TC 7,59; DC 2,42	15,75; 25,27; 8,05	8,05 - 750 (0,991 - 0,998)
DI <i>et al.</i> , 2020	Solução padrão	SDZ 0,014; SPD 0,008; SMR 0,009; SMZ 0,007; SMP 0,009; SMT 0,011; SCP 0,012; SDMX 0,008	0,045; 0,027; 0,030; 0,023; 0,032; 0,037; 0,040; 0,029	0,050 - 10 (>0,996)
LI <i>et al.</i> , 2020	Leite	OFL 1,02; PEF 3,15; NOR 1,59; ENR 2,35; GAT 1,31	3,46; 10,52; 5,33; 7,94; 4,42	5,0 - 200,0 (>0,998)
SAHEBI <i>et al.</i> , 2020	Leites (**)	AMP 0,5 - 0,7; PNG 0,3 - 0,5; AMX 0,4 - 0,5; OXC 0,11 - 0,12; CLX 0,15 - 0,20	0,17 - 0,24; 0,10 - 0,17; 0,14 - 0,17; 0,37 - 0,48; 0,51 - 0,68	0,1 - 300 (>0,998)
TAVASSOLI <i>et al.</i> , 2020	Solução padrão	ERY 2,4	8,8	0,00 - 100 (0,998)
ZHAO <i>et al.</i> , 2020	Leite	AS 1,50; SPD 0,55; SDZ 0,65; SMX 0,55; STZ 0,55; SMR 0,45; SIX 0,55; SMZ 0,40	3,75; 1,80; 1,85; 1,75; 1,80; 1,20; 1,78; 1,10	2,0 - 1000 (0,991 - 0,997)
AQDA <i>et al.</i> , 2019	Leite	AMX 0,8; AMP 0,9; CLX 1,5	2,7; 3,0; 5,0	3 - 1000 (>0,997)
HUANG <i>et al.</i> , 2019	Solução padrão	KAN 0,17	-	0,48 - 96,89 (0,998)
JIANG <i>et al.</i> , 2019	Leite	NOR 0,012; CIP 0,024; PEF 0,016; LOM 0,016; ENR 0,024; OFL 0,016	0,04; 0,08; 0,06; 0,06; 0,08; 0,06;	0,04 - 600 (0,998)
NASIR <i>et al.</i> , 2019	Leite	SDZ 0,15; SMZ 0,17; SMM 0,11; SMX 0,15	0,50; 0,56; 0,36; 0,50	5 - 500 (>0,995)
PENG <i>et al.</i> , 2019	Leite	OTC 0,67; TC 1,13; CTC 6,31; DC 8,05	2,23; 3,76; 21,03; 26,84	10 - 3000 (0,992 - 0,999)

(CONTINUAÇÃO) TABELA 2 - LIMITES DE DETECÇÃO, LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E FAIXA DE LINEARIDADE DOS ANTIBIÓTICOS

Artigo	Veículo (*)	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)	Faixa de linearidade (µg/kg) (R ²)
SADEGUI et al., 2019	Solução padrão	STZ 10; SPD 16,5; SDZ 9,5	33; 50; 30	30 - 50000 (>0,995)
SAHEBI et al., 2019	Leites (**)	CFP (***) 0,02 - 1,18	0,06 - 3,92	0,1 - 400 (>0,996)
XU et al., 2019	Solução padrão	NOR 41; PEF 32; ENR 33; OFL 28; LVX 43; CIP 331; FLE 617; LOM 200	-	72 - 369 (0,989-998)
YU et al., 2019	Solução padrão	OFL 0,5; NOR 1,5; CIP 1,2; ENR 0,4; SAR 0,7; DIF 0,35; PEF 0,55; DAN 0,6	1,5; 5,0; 4,0; 1,5; 2,5; 1,2; 2,0; 2,0	1,5 - 200 (>0,997)
MUHAMMAD et al., 2018	Leite	CAP 0,023	48	10 - 5000 (0,997)
WEI et al., 2018	Solução padrão	TC 102	-	440 - 111000 (0,994)
CHU et al., 2017	Leite	CAP 0,2	-	0,5 - 10 (0,999)
ERSHADI et al., 2017	Solução padrão	ENR 21,00	69	50 - 600 (0,996)
LIU et al., 2017	Leite	CAP 0,293; TAP 0,262; FF 0,216	0,967; 0,864; 0,713	1,00 - 1000 (0,990 - 0,998)
LUAN et al., 2017	Solução padrão	CAP 0,02	-	0,05 - 100 (0,995)
LUAN et al., 2017 ^b	Solução padrão	KAN 0,0002	-	0,0005 - 30 (0,993)
WEI et al., 2017	Leite	ETC 0,016; OTC 0,005; TC 0,008; DMC 0,055; CTC 0,030; ATC 0,005	0,054; 0,017; 0,028; 0,182; 0,101; 0,018	0,03 - 100 (>0,996)
CHEN et al., 2016	Solução padrão	OTC $5,9 \times 10^{-5}$; KAN $7,2 \times 10^{-5}$	-	0,23 - 23×10^6 (0,998)
KAZEMI et al., 2016	Solução padrão	SDZ 0,34	-	1 - 800 (0,999)

(CONTINUAÇÃO) TABELA 2 - LIMITES DE DETECÇÃO, LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E FAIXA DE LINEARIDADE DOS ANTIBIÓTICOS

Artigo	Veículo (*)	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)	Faixa de linearidade (µg/kg) (R ²)
WANG <i>et al.</i> , 2016	Leite	AS 0,12; SDZ 0,08; STZ 0,07; SPD 0,12; SMR 0,11; SMZ 0,08; SMT 0,11; SMM 0,08; SME 0,08; SPC 0,06; SDX 0,03; SMX 0,02; SIX 0,11; SDMX 0,05; SP 0,13	0,38; 0,25; 0,23; 0,38; 0,35; 0,25; 0,35; 0,25; 0,25; 0,18; 0,08; 0,07; 0,35; 0,15; 0,43	2,0 - 100,0 (0,994 - 0,999)
XU <i>et al.</i> , 2016	Solução padrão	TCs (***) 0,61 - 10,34	2,02 -34,46	11 - 89 (>0,992)
HAO <i>et al.</i> , 2015	Solução padrão	CAP 0,01	-	0,01 - 0,2 (0,993)
HU <i>et al.</i> , 2015	Solução padrão	NOR 0,01	-	0,010 - 10 (0,995)
MISHRA <i>et al.</i> , 2015	Leite	SRT 0,3	-	0,3 - 50 (0,997)
RUIZ-PALOMERO <i>et al.</i> , 2015	Solução padrão	DAN 2,5	8,1	8 - 800 (0,999)
HE <i>et al.</i> , 2014	Leite	OFL 1,76; DAN 12,42; ENR 9,20	5,84; 41,38; 30,64	50 - 1000 (>0,996)
LIU <i>et al.</i> , 2014	Solução padrão	TC 0,007; CAP 0,005	0,025; 0,018	0,01 - 50 (0,987 - 0,995)
YOLA <i>et al.</i> , 2014	Solução padrão	TOB 0,003	0,008	0,008 - 0,07 (0,998)
LIU <i>et al.</i> , 2013	Solução padrão	SRT 0,010	-	0,05 - 20 (0,986)

(CONCLUSÃO) TABELA 2 - LIMITES DE DETECÇÃO, LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E FAIXA DE LINEARIDADE DOS ANTIBIÓTICOS

Artigo	Veículo (*)	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)	Faixa de linearidade (µg/kg) (R ²)
D'ORAZIO <i>et al.</i> , 2012	Leite	SBZ 11; SCP 16; SDZ 9; SDMX 24; SDX 8; SGN 6; SMR 4; SME 5; SMZ 24; SMT 7; SMX 9; SMM 12; SNL 5; SPD 2; SQX 8; SIX 40; STZ 4; SMD 16	36; 61; 31; 44; 25; 12; 14; 15; 42; 22; 22; 43; 12; 8; 24; 96; 12; 33	50 - 2500 (>0,995)
LU <i>et al.</i> , 2010	Leite	CAP 0,003	0,008	0,1 - 100 (>0,999)

LEGENDA: LD- limite de detecção; LQ- limite de quantificação; R²- Coeficiente de determinação; SRT- estreptomicina; TC- tetraciclina; CAP- cloranfenicol; ENR- enrofloxacin; ERY- eritromicina; OFL- ofloxacin; NOR- norfloxacin; CIP- ciprofloxacin; SAR- sarafloxacin; DIF- difloxacin; PEF- pefloxacin; DAN- danofloxacin; OTC- oxitetraciclina; CTC- clortetraciclina; DC- doxiciclina; TOB- tobramicina; KAN- canamicina; AMX- amoxicilina; AMP- ampicilina; CLX- cloxaciclina; LOM- lomefloxacin; SDZ- sulfadiazina; ETC- 4-epitetraciclina; DMC- domeclociclina; ATC- anidrotetraciclina; AS- sulfacetamida; SPD- sulfapiridina; SMX- sulfametoxazol; STZ- sulfatiazol; SMR- sulfamerazina; SIX- sulfisoxazol; SMZ- sulfametazina; SBZ- sulfabenzamida; SCP- sulfaclopiridazina; SDMX- sulfadimetoxina; SDX- sulfadoxina; SGN- sulfaguanidina; SME- sulfametro; SMT- sulfametizol; SMM- sulfamonometoxina; SNL- sulfanilamida; SQX- sulfaquinoxalina; SMD- sulfisomidina; SMP- sulfametoxipiridazina; SP- sulfafenazol; GAT- gatifloxacin; PNG- penicilina G; OXC- oxacilina; LVX- levofloxacin; FLE- fleroxacin; TAP- tianfenicol; FF- florfenicol; TCs- tetraciclina; CFP- cefalosporinas.

NOTA: (*) algumas curvas foram realizadas na matriz e outras na solução padrão. (**) valores representam ensaios com leite bovino, leite de cabra e leite de ovelha. (***) os artigos apresentaram um intervalo para todos os antibióticos testados. Em cinza estão os R² <0,995.

FONTE: A autora (2021).

5.4.3 Linearidade

A relação de linearidade é uma das características mais importantes para a validação de procedimentos laboratoriais analíticos. É definida como a capacidade (dentro de um determinado intervalo) de obter os resultados do teste, que são diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra. Assim, deve ser verificado se existe uma relação linear comprovada matematicamente entre os valores observados e as verdadeiras concentrações ou atividades do analito

(HSIEH; LIU; JEN, 2008). O procedimento é realizado com o auxílio da curva de calibração. Existem três tipos possíveis de curvas de calibração aceitas pelo guia de validação do MAPA, são esses: a curva de calibração do analito em solução, construída a partir dos padrões de calibração do analito puro em solvente, que deve ser utilizada apenas quando comprovada a ausência do efeito matriz; a curva de calibração da matriz branca fortificada, construída a partir da matriz fortificada com os padrões de calibração do analito puro; e a curva de calibração do extrato da matriz branca fortificada, nesse caso o extrato da matriz que é fortificado com os padrões dos analitos puros. Dos 38 artigos eleitos, 19 utilizaram a curva de calibração do analito em solução e 19 utilizaram a curva de calibração da matriz branca fortificada (BRASIL, 2011).

O guia de validação brasileira e o guia europeu estabelecem que a curva de calibração deve ser construída com no mínimo cinco níveis de concentração. Nenhum dos estudos utilizaram menos de 5 pontos de concentração nas curvas analíticas apresentadas. Para indicar a linearidade da curva é importante que seja calculado o coeficiente de determinação (R^2) e seu valor deve ser $\geq 0,995$ segundo o guia nacional, os guias internacionais não mencionam o coeficiente. Alguns estudos obtiveram o coeficiente menor que esse estabelecido pelo MAPA, esses coeficientes foram apresentados e sinalizados em cinza na Tabela 2. As faixas de linearidade, que representam a extensão da linearidade do método, também estão apresentadas na Tabela 2. Nos casos em que mais de um antibiótico foi testado, a faixa corresponde ao menor e ao maior valor encontrados no conjunto (BRASIL, 2011; EU, 2002).

5.4.4 Precisão

Segundo o guia de validação estabelecido pelo MAPA, a precisão precisa ser abordada pelo estudo de pelo menos duas formas, são estas: a repetitividade e a reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária). Os valores resultantes destes ensaios normalmente são apresentados por meio do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (%RSD). Os valores ideais para esses coeficientes variam de acordo com as concentrações dos analitos utilizadas no ensaio. Para a repetitividade, os valores do coeficiente de variação devem preferencialmente estar abaixo de dois terços dos valores que são apresentados na Tabela 4, já para

reprodutibilidade intralaboratorial, o coeficiente de variação intralaboratorial da média não deve exceder esses valores (BRASIL, 2011).

Apenas um dos estudos inclusos não apresentou o %RSD para o ensaio de precisão que foi descrito no artigo. Para todos os outros estudos esses valores foram fornecidos e compilados na Tabela 3. Os %RSDs de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial foram confrontados com as exigências da Tabela 4, que apresenta os valores fornecidos pelo manual do MAPA. Levando em conta as concentrações utilizadas em cada ensaio, apenas 5 artigos tiveram algum dos valores de %RSD que não cumpriu o requisito estabelecido pelo guia brasileiro e estão sinalizados em cinza na Tabela 3. Se fosse levado em conta um parâmetro internacional, em que o menor valor exigido é de 15% e que o critério não faz diferença entre a repetitividade e a reprodutibilidade, apenas Ershadi *et al.* (2017) teria pelo menos um de seus coeficientes em desacordo com o estabelecido pela *Codex Alimentarius* (BRASIL, 2011)(EMA, 2009). No entanto, o formato do parâmetro internacional é frequentemente questionado pois o %RSD em condições de reprodutibilidade é, no geral, consideravelmente maior do que em condições de repetitividade. Essas diferenças revelam como a aceitação do critério de precisão pode variar, dificultando a análise comparativa dos ensaios entre estudos diferentes (TIWARI; TIWARI, 2010).

TABELA 3 - VALORES DE PRECISÃO (REPETITIVIDADE E REPRODUTIBILIDADE) E RECUPERAÇÃO DOS ESTUDOS ELEITOS

Artigo	Repetitividade (%RSD)	Reprodutibilidade intralaboratorial (%RSD)	Recuperação (%)
AMIRIPOUR <i>et al.</i> , 2021	6,7 - 9,2	9,5 - 11,7	81 - 122,1
SERESHTI <i>et al.</i> , 2021	2,32 - 3,80	3,29 - 4,25	71 - 104
DI <i>et al.</i> , 2020	<10,3	<10,3	79 - 107
LI <i>et al.</i> , 2020	1,7 - 5,3	1,7 - 4,8	95,5 - 99,0
SAHEBI <i>et al.</i> , 2020	<5,8	<5,8	86,9 - 107,3
TAVASSOLI <i>et al.</i> , 2020	5,6 - 8,5	8,4 - 12,5	89 - 95
ZHAO <i>et al.</i> , 2020	3,66 - 7,11	5,21 - 8,14	80,81 - 106,4
AQDA <i>et al.</i> , 2019	2 - 3	3 - 6	83 - 105
HUANG <i>et al.</i> , 2019	0,16 - 0,51	0,18 - 0,98	91,8 - 105
JIANG <i>et al.</i> , 2019	0,1 - 12,1	2,2 - 11,5	89 - 107,8
NASIR <i>et al.</i> , 2019	1,5 - 5,6	1,9 - 6,8	81,0 - 98,8
PENG <i>et al.</i> , 2019	2,0 - 7,5	1,4 - 6,2	86,2 - 105,7
SADEGUI <i>et al.</i> , 2019	7,5 - 11,1	2,5 - 4,9	92,4 - 109,3
SAHEBI <i>et al.</i> , 2019	1,6 - 7,5	3,7 - 11,3	73,4 - 96,5
XU <i>et al.</i> , 2019	-	-	70 - 100
YU <i>et al.</i> , 2019	5,9 - 9,1	5,8 - 8,3	76,1 - 88,3
MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2018	5,03	14,85	86 - 95
WEI <i>et al.</i> , 2018	2,9 - 4,9	3,8 - 4,5	96,4 - 109,2
CHU <i>et al.</i> , 2017	4,6 - 7,1	8,4	97,5 - 104,0
ERSHADI <i>et al.</i> , 2017	3,7 - 15,5	3,1 - 11	87 - 97
LIU <i>et al.</i> , 2017	4,62 - 9,34	3,66 - 8,52	75,7 - 94,5
LUAN <i>et al.</i> , 2017	7,98	7,98	87,5 - 101
LUAN <i>et al.</i> , 2017 ^b	2,46 - 3,95	4,23 - 6,85	90 - 124
WEI <i>et al.</i> , 2017	1,1 - 5,4	2,0 - 9,7	87,0 - 101,8
CHEN <i>et al.</i> , 2016	5,5 - 7,3	5,5 - 7,3	88,8 - 97,0
KAZEMI <i>et al.</i> , 2016	3,1	5,4	95,3 - 96,6
WANG <i>et al.</i> , 2016	1,0 - 7,3	1,7 - 8,1	73,4 - 97,4
XU <i>et al.</i> , 2016	5,09 - 7,33	0,53 - 1,11	81,5 - 101,4
HAO <i>et al.</i> , 2015	2,7 - 3,9	4,5 - 6,4	94,8 - 103,1
HU <i>et al.</i> , 2015	5,46 - 21,68	3,92 - 18,20	94,03 - 118,70
MISHRA <i>et al.</i> , 2015	3,51	0,28 - 0,56	99,70 - 101,30
RUIZ-PALOMERO <i>et al.</i> , 2015	0,63	0,8	94,4 - 95,9
HE <i>et al.</i> , 2014	2,9 - 8,8	3,5 - 11,5	75,6 - 108,8
LIU <i>et al.</i> , 2014	6,4 - 8,3	8,6 - 9,8	88 - 119
YOLA <i>et al.</i> , 2014	1,25 - 2,27	1,25 - 3,18	97 - 98
LIU <i>et al.</i> , 2013	6,7 - 9,2	9,5 - 11,7	81 - 122,1
D'ORAZIO <i>et al.</i> , 2012	1,2 - 1,8	1,4 - 2,1	85 - 107
LU <i>et al.</i> , 2010	4,02 - 5,53	5,02 - 6,94	99,76 - 101,3

LEGENDA: %RSD- Desvio Padrão Relativo.

NOTA: Em cinza estão os valores em desacordo com o manual do MAPA.

FONTE: A autora (2021).

TABELA 4 - CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO DA PRECISÃO

Concentração (c)	%RSD
$c < 1 \mu\text{g/kg}$	35
$1 \mu\text{g/kg} \leq c < 10 \mu\text{g/kg}$	30
$10 \mu\text{g/kg} \leq c < 100 \mu\text{g/kg}$	20
$100 \mu\text{g/kg} \leq c < 1 \text{ mg/kg}$	15
$1 \text{ mg/kg} \leq c < 10 \text{ mg/kg}$	10
$10 \text{ mg/kg} \leq c < 100 \text{ mg/kg}$	7,3
$100 \text{ mg/kg} \leq c < 1 \text{ g/kg}$	5,3
$1 \text{ g/kg} \leq c < 10 \text{ g/kg}$	3,7
$10 \text{ g/kg} \leq c < 100 \text{ g/kg}$	2,7
$100 \text{ g/kg} \leq c < 1 \text{ kg/kg}$	2,0

LEGENDA: %RSD- Desvio Padrão Relativo.

FONTE: Adaptado de Brasil (2011).

5.4.5 Recuperação

A determinação da recuperação aponta para a veracidade do estudo, ou seja, a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio, nesse caso a análise dos antibióticos no leite, e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. Segundo o manual de garantia de qualidade, os valores de recuperação devem estar dentro de intervalos especificados por norma, legislação específica, contrato com o cliente, ou na falta desses, especificados internamente no laboratório ao redor de 100%, de acordo com as respectivas faixas de concentrações. Logo, é um parâmetro que pode ter sua aceitabilidade variável, assim como a precisão. No entanto, seguindo o proposto pelo manual brasileiro estabelecido com base no guia internacional da União Europeia, esses valores devem estar compreendidos nos intervalos apresentados na Tabela 5, levando em consideração as concentrações do analito utilizadas no ensaio de recuperação (BRASIL, 2011; EU, 2002).

Na Tabela 3 estão listados todos os valores de recuperação dos estudos inclusos. Esses valores foram confrontados com os valores recomendados pelo manual do MAPA e aqueles que não cumpriram os limites inferiores ou superiores dos valores de recuperação foram sinalizados com a marcação cinza. Dos 38 estudos, 11

apresentaram um ou mais valores em desacordo com o proposto pelo guia nacional bem como o guia internacional (BRASIL, 2011; EU, 2002).

Os estudos de recuperação para validar o desempenho de um método analítico enfrenta alguns problemas, como cálculo inadequado dos dados e interpretação equivocada dos resultados. No entanto, podem ser úteis para ajudar a compreender vieses revelados na comparação de experimentos de métodos (WESTGARD; QUAN, 2019).

TABELA 5 - FAIXAS DE ACEITAÇÃO PARA OS VALORES DE RECUPERAÇÃO ACIMA E ABAIXO DE 100%

Concentração (c)	Intervalos (%)
$c \leq 1 \mu\text{g/kg}$	-50 % a +20%
$1 \mu\text{g/kg} < c < 10 \mu\text{g/kg}$	-30 % a +10 %
$c \geq 10 \mu\text{g/kg}$	-20 % a +10 %

FONTE: Adaptado Brasil (2011).

5.4.6 Efeito matriz

Como mencionado anteriormente, o efeito matriz é um estudo de seletividade que avalia as possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral, no caso dos estudos analisados as substâncias presentes no leite, e que podem diminuir ou aumentar o sinal ou resposta instrumental. De acordo com essa definição, é possível entender porque alguns estudos classificam o efeito matriz como seletividade em si, quando na verdade a seletividade abrange ainda outros possíveis interferentes (BRASIL, 2011).

Para avaliar o efeito matriz normalmente são preparadas curvas de calibração com a substância referência do(s) analito(s) em solvente e na matriz. Devem ser calculados os coeficientes angulares dessas curvas para que possa ser estimado o efeito matriz. O estudo desse parâmetro não é necessário nos casos em que se utiliza uma curva de calibração da matriz branca fortificada ou curva de calibração do extrato da matriz branca fortificada como a base para o estudo. Partindo dessa regra, apenas 19 (50%) dos 38 artigos deveriam ter investigado esse parâmetro de validação. Desses, apenas quatro mencionaram o efeito matriz. Três desses estudos avaliaram o efeito matriz a partir dos coeficientes angulares das curvas de calibração da matriz e da solução padrão como recomendado pelo guia do MAPA. Ao compararem os coeficientes angulares, Yu *et al.* (2019), Xu *et al.* (2016) e Di *et al.* (2020) concluíram

que não houve efeito matriz significativa. Tavassoli *et al.* (2020) avaliaram o efeito matriz por meio da análise da recuperação do analito na matriz fortificada, na matriz após o processo de extração dos analitos e os analitos em solução padrão. Segundo este estudo, o efeito médio da matriz em três níveis de concentração de eritromicina foi de 12,7% e não pode afetar significativamente o desempenho da determinação do antibiótico.

A avaliação do efeito matriz é especialmente importante nas cromatografias líquidas, nas quais amostras de baixa pureza podem causar supressão de sinal, fundo elevado e outros efeitos negativos para esse grupo de técnicas. É visto que os efeitos da matriz não são considerados para a maioria das validações de métodos analíticos se não influenciarem na reprodutibilidade ou na linearidade do ensaio, mas o que pode ser observado com frequência são métodos devidamente validados sofrendo de perda de sensibilidade atribuível a efeitos da matriz, normalmente resultantes de purificações cromatográficas insuficientes. Dessa forma, é desejável que esse parâmetro seja sempre considerado no desenvolvimento de metodologias analíticas, principalmente quando envolvem amostras complexas, como é o caso do leite (ROGATSKY; STEIN, 2005; STEINER; KRSKA; MALACHOVÁ; TASCHL *et al.*, 2020).

5.4.7 Robustez

O guia de validação brasileiro elucida que a robustez deve ser avaliada com a demonstração de que o método é estável sob diferentes condições, diferentes fabricantes de insumos e colunas cromatográficas, dentre outras variações. Os guias internacionais também consideram a robustez com definições muito semelhantes (BRASIL, 2011; EU, 2002; FDA, 2019). Esse parâmetro foi pouco mencionado nos estudos eleitos, sendo que apenas os autores de dois artigos trouxeram a palavra “*robustness*” ou “*ruggedness*”, suas equivalentes em inglês. Yola *et al.* (2014) consideraram para a avaliação da robustez a aplicação do método proposto por dois analistas distintos e comparou os resultados obtidos por eles com o auxílio do teste Wilcoxon e, como não houve diferença significativa entre os resultados, os autores concluíram que o método era robusto. Já Sahebi *et al.* (2020) mencionaram a robustez na etapa de *design* de experimentos que foi realizada pelo estudo. A partir dos

modelos ajustados, foi verificada uma robustez adequada ao obter coeficientes de correlação acima de 0,98.

Os testes de robustez foram introduzidos originalmente para evitar problemas em estudos interlaboratoriais e para identificar os fatores potencialmente responsáveis por possíveis diferenças nos resultados, um aspecto importante ao considerar uma metodologia como oficial para a avaliação de alguma substância. A realização tardia do teste de robustez no desenvolvimento de uma metodologia analítica envolve o risco de que, quando um método não é robusto, este deve ser desenvolvido novamente e otimizado. Nesse momento, muito esforço, tempo e dinheiro já foram gastos, dessa forma, é imprescindível que esse parâmetro seja avaliado no final do desenvolvimento do método ou no início do procedimento de validação para que os ajustes sejam realizados o mais brevemente possível (HEYDEN; NIJHUIS; SMEYERS-VERBEKE; VANDEGINSTE *et al.*, 2001).

5.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente estudo contou com algumas limitações ao longo do seu desenvolvimento. Podem ser mencionadas a necessidade de delimitar de forma independente os parâmetros de validação analisados, a limitação da aplicação nanotecnológica por meio do termo “nano” e a impossibilidade de avaliar a qualidade metodológica desses estudos.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento desse estudo possibilitou uma avaliação mais criteriosa das metodologias para detecção de antibióticos no leite com aplicações nanotecnológicas disponíveis em três grandes bases de dados científicas. Um volume considerável de artigos relacionados a esse tema foi encontrado, mas ao considerar critérios de validação das metodologias, poucos estudos foram selecionados para a revisão sistemática. Os países que mais se destacaram na produção dos artigos eleitos foram a China e o Irã. As publicações se encontram dentro dos últimos onze anos e é possível notar o crescimento no número de artigos publicados ao longo do intervalo de tempo avaliado. Não foram encontrados no grupo eleito estudos com derivados do leite.

O antibiótico mais investigado foi o cloranfenicol, muito provavelmente em decorrência da proibição do seu uso em animais de criação, que muitas vezes é violada na busca por produtividade. A técnica analítica mais empregada foi a CLAE, na maioria dos casos visando ao melhoramento do preparo das amostras utilizando a EFS e suas variações com aplicações nanotecnológicas. Sendo assim, foi observada a preferência por otimizar as técnicas que já são amplamente utilizadas ao invés da inserção de técnicas novas nesse campo analítico. Além da aplicação na fase de extração, com destaque para MSPE, as propriedades ópticas únicas de nanopartículas foram bastante consideradas nos estudos. Entre as nanoestruturas mencionadas, duas tiveram destaque, os MOFs e os MIPs, ambas com aplicações diversas e contribuição direta para a maior seletividade dos métodos.

Em relação à validação das metodologias analíticas, quanto aos parâmetros exigidos previamente pela revisão sistemática, a maioria dos artigos cumpriram os limites estabelecidos pelo guia de qualidade analítica do MAPA e os guias internacionais. Em relação aos parâmetros mais conceituais, no caso, a seletividade, o efeito matriz e a robustez, os estudos foram pouco homogêneos entre si na avaliação desses critérios. De forma geral, fica clara a importância do maior emprego da validação no desenvolvimento das metodologias analíticas visando ao emprego futuro dessas por órgãos regulatórios, e uma unificação dos critérios de aceitabilidade para que os estudos de desenvolvimento de metodologias possam ser comparados entre si.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALIPOUR, F.; MIRLOHI, M.; JALALI, M.; AZADBAKHT, L. Dietary exposure to tetracycline residues through milk consumption in Iran. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, 13, n. 1, 2015.
- AHMED, S.; NING, J.; PENG, D.; CHEN, T. *et al.* Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review. **Food and Agricultural Immunology**, 31, n. 1, p. 268-290, 2020.
- AHN, E.; KANG, H. Introduction to systematic review and meta-analysis. **Korean Journal of Anesthesiology**, 71, n. 2, p. 103-103, 2018.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, 36, n. 6, p. 697-705, 2005.
- ALIMOHAMMADI, M.; ASKARI, G.; AZGHADI, M.; TAGHAVIMANESH, V. *et al.* Antibiotic residues in the raw and pasteurized milk produced in Northeastern Iran examined by the four-plate test (FPT) method. **International Journal of Food Properties**, 23, n. 1, p. 1248-1255, 2020.
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, 1, n. 134, p. 1-7, 2010.
- ARAKAWA, Y. Systematic research to overcome newly emerged multidrug-resistant bacteria. : Blackwell Publishing Asia. 64: 231-251 p. 2020.
- ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, 877, n. 23, p. 2224-2234, 2009.
- ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. **The Clinical Biochemist Reviews**, 29, n. Suppl 1, p. S49-S49, 2008.
- AROMATARIS, E.; PEARSON, A. The systematic review: An overview. **American Journal of Nursing**, 114, n. 3, p. 53-58, 2014.
- AROMATARIS, E. E.; MUNN, Z. E. JBI Manual for Evidence Synthesis. **Joanna Briggs Institute**, 2020.
- BACANLI, M.; BAŞARAN, N. Importance of antibiotic residues in animal food. : Elsevier Ltd. 125: 462-466 p. 2019.

BARNETT, N. W.; FRANCIS, P. S. CHEMILUMINESCENCE | Overview. **Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition**, p. 506-511, 2005.

BARRETT, J. F. Can biotech deliver new antibiotics? : *Curr Opin Microbiol.* 8: 498-503 p. 2005.

BASSETT, E. J.; KEITH, M. S.; ARMELAGOS, G. J.; MARTIN, D. L. *et al.* Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). **Science**, 209, n. 4464, p. 1532-1534, 1980.

BATES, J.; JORDENS, J. Z.; GRIFFITHS, D. T. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 34, n. 4, p. 507-514, 1994.

BELBRUNO, J. J. Molecularly Imprinted Polymers. **Chemical Reviews**, 119, n. 1, p. 94-119, 2018.

BELOGLAZOVA, N. V.; EREMIN, S. A. Design of a sensitive fluorescent polarization immunoassay for rapid screening of milk for cephalexin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 407, n. 28, p. 8525-8532, 2015.

BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection Ecology & Epidemiology**, 5, n. 1, p. 28564-28564, 2015.

BERNAL, E. Limit of Detection and Limit of Quantification Determination in Gas Chromatography. **Advances in Gas Chromatography**, 2014.

BETZ, J. M.; BROWN, P. N.; ROMAN, M. C. Accuracy, Precision, and Reliability of Chemical Measurements in Natural Products Research. **Fitoterapia**, 82, n. 1, p. 44-44, 2011.

BHAND, S.; MISHRA, G. K. Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance (EQCN) Based Biosensor for Sensitive Detection of Antibiotic Residues in Milk. **Methods in Molecular Biology**, 1572, p. 263-276, 2017.

BHOSALE, R. R.; OSMANI, R. A.; GHODAKE, P. P.; SHAIKH, S. M. *et al.* Mastitis: An Intensive Crisis in Veterinary Science Corresponding author *. 2, n. 2, p. 96-103, 2014.

BITEW, Z.; AMARE, M. Recent reports on electrochemical determination of selected antibiotics in pharmaceutical formulations: A mini review. **Electrochemistry Communications**, 121, p. 106863-106863, 2020.

BLANCO, G.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, I.; MORINHA, F.; LÓPEZ-CERERO, L. Intensive farming as a source of bacterial resistance to antimicrobial agents in sedentary and migratory vultures: Implications for local and transboundary spread. **Science of the Total Environment**, 739, p. 140356-140356, 2020.

BONERBA, E.; PANSERI, S.; ARIOLI, F.; NOBILE, M. *et al.* Determination of antibiotic residues in honey in relation to different potential sources and relevance for food inspection. **Food Chemistry**, 334, p. 127575-127575, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 253, de 16 de setembro de 2003. Brasília: Diário Oficial da União 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 253, de 16 de setembro de 2003. Brasília: Diário Oficial da União 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa – IN n° 51, de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. . Brasília: Diário Oficial da União 2019.

BUCHY, P.; ASCIOGLU, S.; BUISSON, Y.; DATTA, S. *et al.* Impact of vaccines on antimicrobial resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, 90, p. 188-196, 2020/01/01/ 2020.

BURNS, D. T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. A Tutorial Discussion of the use of the terms "Robust" and "Rugged" and the Associated Characteristics of "Robustness" and "Ruggedness" as used in Descriptions of Analytical Procedures. **Journal of the Association of Public Analysts**, 37, p. 40-60, 2009.

BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 42, n. 3, p. 198-213, 2012.

CANFAROTTA, F.; CECCHINI, A.; PILETSKY, S. CHAPTER 1 Nano-sized Molecularly Imprinted Polymers as Artificial Antibodies. **RSC Polymer Chemistry Series**, 2018-January, n. 28, p. 1-27, 2018.

CHÁFER-PERICÁS, C.; MAQUIEIRA, Á.; PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 29, n. 9, p. 1038-1049, 2010.

CHIDAMBARAM, A.; STYLIANOU, K. C. Electronic metal–organic framework sensors. **Inorganic Chemistry Frontiers**, 5, n. 5, p. 979-998, 2018.

CUTIGNANO, A. Analytical Approaches for the Identification of Quorum Sensing Molecules. **Quorum Sensing: Molecular Mechanism and Biotechnological Application**, p. 29-53, 2019.

DA CUNHA, B. R.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? : MDPI AG. 8 2019.

DAVID, J. C.; BUCHET, A.; SIALELLI, J. N.; DELOUVÉE, S. The use of antibiotics in veterinary medicine: Representations of antibiotics and biosecurity by pig farmers. **Pratiques Psychologiques**, 2020.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiología (Madrid, Spain)**, 12, n. 1, p. 9-16, 2010.

DE FARIA, L. V.; LISBOA, T. P.; CAMPOS, N. d. S.; ALVES, G. F. *et al.* Electrochemical methods for the determination of antibiotic residues in milk: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, 1173, p. 338569-338569, 2021.

DE NOVAES, S. F.; SCHREINER, L. L.; E SILVA, I. P.; FRANCO, R. M. Resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Ciencia Rural**, 47, n. 8, p. 8-8, 2017.

DEMAIN, A. L. Antibiotic discovery: A step in the right direction. : Elsevier Ltd. 18: 939-939 p. 2011.

DI PIETRANTONIO, F.; CANNATÀ, D.; BENETTI, M. Biosensor technologies based on nanomaterials. **Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications**, p. 181-242, 2019.

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. : Elsevier B.V. 53: 371-382 p. 2019.

EBERT, I.; BACHMANN, J.; KÜHNEN, U.; KÜSTER, A. *et al.* Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 30, n. 12, p. 2786-2792, 2011.

EHRLICH, P.; HATA, S. Experimentelle Grundlage der Chemotherapie der Spirillosen. *In*: : Springer Berlin Heidelberg, 1910. p. 1-85.

EU. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C (2002) 3044). : European Commission 2002.

FAO. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods - CX/MRL 2-2018. : Codex Alimentarius Commission 2018.

FDA. Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products. : Foods Program 2019.

FERRI, M.; RANUCCI, E.; ROMAGNOLI, P.; GIACCONE, V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57, n. 13, p. 2857-2876, 2017.

FLEISCHER, P.; METZNER, M.; BEYERBACH, M.; HOEDEMAKER, M. *et al.* **The Relationship Between Milk Yield and the Incidence of Some Diseases in Dairy Cows**. American Dairy Science Association, p. 2025-2035. 2001.

FLEMING, A. **PENICILLIN'S FINDER ASSAYS ITS FUTURE; Sir Alexander Fleming Says Improved Dosage Method Is Needed to Extend Use Other Scientists Praised Self-Medication Decried** 1945.

FLOREZ, D. H. A.; DUTRA, F. V. A.; BORGES, K. B. Magnetic solid phase extraction employing a novel restricted access material based on mesoporous polyaniline coated with hydrophilic monomers and casein for determination of antibiotics in milk samples. **Microchemical Journal**, 150, p. 104145-104145, 2019.

FONT, H.; ADRIAN, J.; GALVE, R.; ESTÉVEZ, M. C. *et al.* Immunochemical Assays for Direct Sulfonamide Antibiotic Detection In Milk and Hair Samples Using Antibody Derivatized Magnetic Nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, n. 3, p. 736-743, 2008.

GAMA, M. R.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Nano-liquid chromatography in pharmaceutical and biomedical research. **Journal of Chromatographic Science**, 51, n. 7, p. 694-703, 2013.

GAUDIN, V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. : Elsevier Ltd. 90: 363-377 p. 2017.

GIUSTINI, A. J.; SCHROEDER, A. R.; AXELROD, D. M. Trends in Views of Articles Published in 3 Leading Medical Journals During the COVID-19 Pandemic. **JAMA Network Open**, 4, n. 4, p. e216459-e216459, 2021.

GRIBOFF, J.; CARRIZO, J. C.; BONANSEA, R. I.; VALDÉS, M. E. *et al.* Multiantibiotic residues in commercial fish from Argentina. The presence of mixtures of antibiotics in edible fish, a challenge to health risk assessment. **Food Chemistry**, 332, p. 127380-127380, 2020.

HARRIS, L.; LAKSHMANAN, R. S.; EFREMOV, V.; KILLARD, A. J. Point of care (POC) blood coagulation monitoring technologies. **Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications**, p. 203-227, 2017.

HARVEY, D. Analytical chemistry 2.0--an open-access digital textbook. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 399, n. 1, p. 149-152, 2011.

HASSAN, M. M.; EL ZOWALATY, M. E.; LUNDKVIST, Å.; JÄRHULT, J. D. *et al.* Residual antimicrobial agents in food originating from animals. : Elsevier Ltd. 111: 141-150 p. 2021.

HE, H.; SUN, D.-W.; PU, H.; CHEN, L. *et al.* Applications of Raman spectroscopic techniques for quality and safety evaluation of milk: A review of recent developments. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 59, n. 5, p. 770-793, 2019.

HELLIWELL, R.; MORRIS, C.; RAMAN, S. Antibiotic stewardship and its implications for agricultural animal-human relationships: Insights from an intensive dairy farm in England. **Journal of Rural Studies**, 78, p. 447-456, 2020.

HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G. M. *et al.* Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 24, n. 5-6, p. 723-753, 2001.

HSIEH, E.; LIU; JEN, P. On Statistical Evaluation of the Linearity in Assay Validation. **Journal of Biopharmaceutical Statistics**, 18, n. 4, p. 677-690, 2008.

HU, B.; HE, M.; CHEN, B. Magnetic nanoparticle sorbents. **Solid-Phase Extraction**, p. 235-284, 2020.

HUNT, A.; KIRSCH, D. R. Decision making in the pharmaceutical industry – A tale of three antibiotics. : Elsevier B.V. 581: 119251-119251 p. 2020.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. : Elsevier Ltd. 51: 72-80 p. 2019.

IBARRA, I. S.; RODRIGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A.; CEPEDA, A. *et al.* Magnetic solid phase extraction applied to food analysis. **Journal of Chemistry**, 2015, 2015.

INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). : INMETRO 2012.

JELINKOVA, P.; MAZUMDAR, A.; SUR, V. P.; KOCIOVA, S. *et al.* Nanoparticle-drug conjugates treating bacterial infections. : Elsevier B.V. 307: 166-185 p. 2019.

KANTIANI, L.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analytical methodologies for the detection of β -lactam antibiotics in milk and feed samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 28, n. 6, p. 729-744, 2009.

KAPAJ, A.; DECI, E. World milk production and socio-economic factors effecting its consumption. *In*: : Elsevier Inc., 2017. p. 107-115.

KHAMENEH, B.; DIAB, R.; GHAZVINI, K.; FAZLY BAZZAZ, B. S. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. : Academic Press. 95: 32-42 p. 2016.

KHARE, S.; WILLIAMS, K.; GOKULAN, K. Nanotechnology. **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**, p. 893-900, 2014.

KIVITS, T.; BROERS, H. P.; BEELTJE, H.; VAN VLIET, M. *et al.* Presence and fate of veterinary antibiotics in age-dated groundwater in areas with intensive livestock farming. **Environmental Pollution**, 241, p. 988-998, 2018.

KLARE, I.; HEIER, H.; CLAUS, H.; BÖHME, G. *et al.* Enterococcus faecium Strains with vanA-Mediated High-Level Glycopeptide Resistance Isolated from Animal Foodstuffs and Fecal Samples of Humans in the Community. **Microbial Drug Resistance**, 1, n. 3, p. 265-272, 1995.

KLEIN, G.; FRANZ, C. M. A. P. Chapter 9 The farm animal as potential reservoir of antibiotic resistant bacteria in the food chain. **Biology of Growing Animals**, 2, n. C, p. 191-207, 2005.

KOCH, B. J.; HUNGATE, B. A.; PRICE, L. B. Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: the role of ecology. : Wiley Blackwell. 15: 309-318 p. 2017.

KONG, D.; XIE, Z.; LIU, L.; SONG, S. *et al.* Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of vancomycin in raw milk and animal feed. **Food and Agricultural Immunology**, 28, n. 3, p. 414-426, 2017.

KONIECZKA, P. Validation and Regulatory Issues for Sample Preparation. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, 2, p. 699-711, 2012.

KUMBHAKAR, P.; RAY, S. S.; STEPANOV, A. L. Optical properties of nanoparticles and nanocomposites. **Journal of Nanomaterials**, 2014, 2014.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites. **Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites**, 1993.

LEE, C. R.; CHO, I. H.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Strategies to minimize antibiotic resistance. : Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 10: 4274-4305 p. 2013.

LIMMATHUROTSAKUL, D.; SANDOE, J. A. T.; BARRETT, D. C.; CORLEY, M. *et al.* 'Antibiotic footprint' as a communication tool to aid reduction of antibiotic consumption. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, 74, n. 8, p. 2122-2127, 2019.

LIU, M.; FRANKO, M. Thermal Lens Spectrometry: Still a Technique on the Horizon? **International Journal of Thermophysics**, 37, n. 7, p. 1-16, 2016.

MACLACHLAN, D. J.; MUELLER, U. A refined approach to estimate exposure for use in calculating the Maximum Residue Limit of veterinary drugs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 62, n. 1, p. 99-106, 2012.

MAJDINASAB, M.; MISHRA, R. K.; TANG, X.; MARTY, J. L. Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors. : Elsevier B.V. 127: 115883-115883 p. 2020.

MAJEWSKI, M. B.; NOH, H.; ISLAMOGLU, T.; FARHA, O. K. NanoMOFs: little crystallites for substantial applications. **Journal of Materials Chemistry A**, 6, n. 17, p. 7338-7350, 2018.

MALDANER, L.; SALES, I. C.; JARDIM, F. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (HPLC):197-200HPLC-Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, 4, n. 3, 2012.

MANIMEKALAI, M.; RAWSON, A.; SENGAR, A. S.; KUMAR, K. S. Development, Optimization, and Validation of Methods for Quantification of Veterinary Drug Residues in Complex Food Matrices Using Liquid-Chromatography—A Review. **Food Analytical Methods** 2019 12:8, 12, n. 8, p. 1823-1837, 2019.

MARSON, B. M.; CONCENTINO, V.; JUNKERT, A. M.; FACHI, M. M. *et al.* VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW FOCUSED ON HPLC METHODS. **Química Nova**, 43, n. 8, p. 1190-1203, 2020.

MARTINEZ, M. N.; WATTS, J. L.; GILBERT, J. M. Questions associated with the development of novel drugs intended for the treatment of bacterial infections in veterinary species. : Bailliere Tindall Ltd. 248: 79-85 p. 2019.

MARTOS, P. A.; JAYASUNDARA, F.; DOLBEER, J.; JIN, W. *et al.* Multiclass, Multiresidue Drug Analysis, Including Aminoglycosides, in Animal Tissue Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry†. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, n. 10, p. 5932-5944, 2010.

MCCARTHY, N. The Countries Leading The World In Scientific Publications [Infographic]. **Forbes**, 2019.

MCDONALD, L. C.; KUEHNERT, M. J.; TENOVER, F. C.; JARVIS, W. R. Vancomycin-Resistant Enterococci Outside the Health-Care Setting: Prevalence, Sources, and Public Health Implications. **Emerging Infectious Diseases**, 3, n. 3, p. 311-317, 1997.

MCFALL-NGAI, M.; HADFIELD, M. G.; BOSCH, T. C. G.; CAREY, H. V. *et al.* Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. : National Academy of Sciences. 110: 3229-3236 p. 2013.

MENKEM, Z. o. E.; NGANGOM, B. L.; TAMUNJOH, S. S. A.; BOYOM, F. F. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. **Acta Ecologica Sinica**, 39, n. 5, p. 411-415, 2019.

METZGER, S. A.; HERNANDEZ, L. L.; SUEN, G.; RUEGG, P. L. Understanding the Milk Microbiota. : W.B. Saunders. 34: 427-438 p. 2018.

MOOSAVI, S. M.; GHASSABIAN, S. Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. **Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches**, 2018.

MOREIRA, R. P. L. Desenvolvimento e validação de métodos multirresíduos para determinação de medicamentos veterinários em alimentos e em ração utilizando CL-EM/EM. Tese (Doutorado em Ciências – Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2012.

MORETTI, S.; DUSI, G.; GIUSEPPONI, D.; PELLICCIOTTI, S. *et al.* Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat. **Journal of Chromatography A**, 1429, p. 175-188, 2016.

MUÑOZ-OLIVAS, R. Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 23, n. 3, p. 203-216, 2004.

NELSON, M. L.; DINARDO, A.; HOCHBERG, J.; ARMELAGOS, G. J. Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE. **American Journal of Physical Anthropology**, 143, n. 1, p. 151-154, 2010.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R. d.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. *et al.* Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Food Science and Technology**, 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

NIR, O., 2003, **What are production diseases, and how do we manage them?** BioMed Central. 21-32. Disponível em: <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-44-S1-S21>.

NISHA, A. R. Antibiotic residues - A global health hazard. **Veterinary World**, 1, n. 12, p. 375-377, 2008.

PAIGE, J. C.; TOLLEFSON, L.; MILLER, M. Public health impact on drug residues in animal tissues. 39: 162-169 p. 1997.

PAPICH, M. G. **Drugs Prohibited from Use in Food-Producing Animals**. 5ª edição ed. W.B. Saunders, 2020. 172-173 p. 978-0-323-70957-6.

PATEL, A.; PATRA, F.; SHAH, N.; KHEDKAR, C. Application of Nanotechnology in the Food Industry: Present Status and Future Prospects. **Impact of Nanoscience in the Food Industry**, p. 1-27, 2018.

PATEL, P. D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 21, n. 2, p. 96-115, 2002.

PATEL, S. J.; WELLINGTON, M.; SHAH, R. M.; FERREIRA, M. J. Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. : Excerpta Medica Inc. 42: 1649-1658 p. 2020.

PEREIRA, M. N.; SCUSSEL, V. M. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: Fonte de contaminação, impactos e controle. **Revista de Ciencias Agroveterinarias**, 16, n. 2, p. 170-182, 2017.

PIETSCHMANN, J.; DITTMANN, D.; SPIEGEL, H.; KRAUSE, H. *et al.* A Novel Method for Antibiotic Detection in Milk Based on Competitive Magnetic Immunodetection. **Foods (Basel, Switzerland)**, 9, n. 12, p. 1773-1773, 2020.

PIKKEMAAT, M. G. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. : Springer. 395: 893-905 p. 2009.

POLVEIRO, R. C.; VIDIGAL, P. M. P.; MENDES, T. A. d. O.; YAMATOGLI, R. S. *et al.* Effects of enrofloxacin treatment on the bacterial microbiota of milk from goats with persistent mastitis. **Scientific Reports 2020 10:1**, 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

POPPE, C.; SMART, N.; KHAKHRIA, R.; JOHNSON, W. *et al.* Salmonella typhimurium DT104: A virulent and drug-resistant pathogen. : Canadian Veterinary Medical Association. 39: 559-565 p. 1998.

PRAJWAL, S.; VASUDEVAN, V. N.; SATHU, T.; PAME, K. The Pharma Innovation Journal 2017; 6(12): 01-04 Antibiotic residues in food animals: Causes and health effects. 2017.

PRESCOTT, J. F. History and Current Use of Antimicrobial Drugs in Veterinary Medicine. *In*: : American Society of Microbiology, 2017. p. 1-16.

QUAIK, S.; EMBRANDIRI, A.; RAVINDRAN, B.; HOSSAIN, K. *et al.* Veterinary antibiotics in animal manure and manure laden soil: Scenario and challenges in Asian countries. : Elsevier B.V. 32: 1300-1305 p. 2020.

RAGEH, A. H.; ABDEL-RAHIM, S. A.; ASKAL, H. F.; SALEH, G. A. Hydrophilic-interaction planar chromatography in ultra-sensitive determination of α -aminocephalosporin antibiotics. Application to analysis of cefalexin in goat milk samples using modified QuEChERS extraction technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 166, p. 421-434, 2019.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 129, p. 115913-115913, 2020.

RATHER, I. A.; KIM, B. C.; BAJPAI, V. K.; PARK, Y. H. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. : Elsevier B.V. 24: 808-812 p. 2017.

REDDING, L. E.; BARG, F. K.; SMITH, G.; GALLIGAN, D. T. *et al.* The role of veterinarians and feed-store vendors in the prescription and use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. **Journal of Dairy Science**, 96, n. 11, p. 7349-7354, 2013.

RIBANI, M.; BEATRIZ, C.; BOTTOLI, G.; COLLINS, C. H. *et al.* VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Quim. Nova**, 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIFKIND, D.; FREEMAN, G. L. PRONTOSIL AND THE SULFONAMIDES. *In*: : Elsevier, 2005. p. 39-42.

ROCA, M.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Thermodynamic analysis of the thermal stability of sulphonamides in milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. **Food Chemistry**, 136, n. 2, p. 376-383, 2013.

ROCHA, D. C.; DA SILVA ROCHA, C.; TAVARES, D. S.; DE MORAIS CALADO, S. L. *et al.* Veterinary antibiotics and plant physiology: An overview. : Elsevier B.V. 767: 144902-144902 p. 2021.

ROGATSKY, E.; STEIN, D. Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 16, n. 11, p. 1757-1759, 2005.

SACHI, S.; FERDOUS, J.; SIKDER, M. H.; HUSSANI, S. M. A. K. Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, 6, n. 3, p. 315-315, 2019.

SANGANYADO, E.; GWENZI, W. Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks. : Elsevier B.V. 669: 785-797 p. 2019.

SEYMOUR, E. H.; JONES, G. M.; MCGILLIARD, M. L. Persistence of Residues in Milk Following Antibiotic Treatment of Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, 71, n. 8, p. 2292-2296, 1988.

SHOJADOOST, B.; YITBAREK, A.; ALIZADEH, M.; KULKARNI, R. R. *et al.* Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. : Elsevier Inc. 100: 100930-100930 p. 2021.

SINGH, S. B. Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. : Elsevier Ltd. 24: 3683-3689 p. 2014.

SKOOG, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. D. A.; WEST. Fundamentos de Química Análítica. p. 1124-1124, 2005.

SLOANE, P. D.; ZIMMERMAN, S. The Impact of the COVID-19 Pandemic on Scientific Publishing. **Journal of the American Medical Directors Association**, 22, n. 3, p. 484-488, 2021.

STEAD, S.; SHARMAN, M.; TARBIN, J. A.; GIBSON, E. *et al.* Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. **Food Additives & Contaminants**, 21, n. 3, p. 216-221, 2007.

STEINER, D.; KRSKA, R.; MALACHOVÁ, A.; TASCHL, I. *et al.* Evaluation of Matrix Effects and Extraction Efficiencies of LC–MS/MS Methods as the Essential Part for Proper Validation of Multiclass Contaminants in Complex Feed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 68, n. 12, p. 3868-3880, 2020.

SWETHA SRI, R.; BHAVYA SRI, K.; MOUNIKA, C. A review on comparative study of hplc and uplc. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, 13, n. 3, p. 1570-1574, 2020.

TASCI, F.; CANBAY, H. S.; DOGANTURK, M. Determination of antibiotics and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Food Control**, 127, p. 108147-108147, 2021.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.

TIAN, H.; WANG, J.; ZHANG, Y.; LI, S. *et al.* Quantitative multiresidue analysis of antibiotics in milk and milk powder by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 1033-1034, p. 172-179, 2016.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharmaceutical Methods**, 1, n. 1, p. 25-25, 2010.

TOPI, D.; SPAHIU, J. Presence of veterinary antibiotics in livestock manure in two Southeastern Europe countries, Albania and Kosovo. **Environmental Science and Pollution Research** 2020 **27:35**, 27, n. 35, p. 44552-44560, 2020.

UMAN, L. S. Systematic Reviews and Meta-Analyses. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, 20, n. 1, p. 57-57, 2011.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VAN BOECKEL, T. P.; PIRES, J.; SILVESTER, R.; ZHAO, C. *et al.* Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- And middle-income countries. **Science**, 365, n. 6459, 2019.

VASQUEZ, A. K.; GANDA, E. K.; CAPEL, M. B.; EICKER, S. *et al.* The microbiome of *Escherichia coli* and culture-negative nonsevere clinical mastitis: Characterization and associations with linear score and milk production. **Journal of Dairy Science**, 102, n. 1, p. 578-594, 2019.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J. F.; DANZER, K. *et al.* Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

WANG, Q.; ZHAO, W. M. Optical methods of antibiotic residues detections: A comprehensive review. : Elsevier B.V. 269: 238-256 p. 2018.

WANG, W.; LIU, L.; XU, L.; MA, W. *et al.* Detection of β -lactamase residues in milk by sandwich ELISA. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 10, n. 7, p. 2688-2698, 2013.

WESTGARD, W. J. O.; QUAN, E. F. Interference and Recovery Experiments. **Westgard QC**, 2019.

WITTE, W. Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. **CIBA Foundation Symposia**, 207, n. 207, p. 61-75, 1997.

WORDEN, R. H. ANALYTICAL METHODS | Geochemical Analysis (Including X-ray). **Encyclopedia of Geology**, p. 54-76, 2005.

WU, Y. Y.; HUANG, P.; WU, F. Y. A label-free colorimetric aptasensor based on controllable aggregation of AuNPs for the detection of multiplex antibiotics. **Food Chemistry**, 304, p. 125377-125377, 2020.

YADAV, V.; SATHEESH KUMAR, T. Present scenario of antibiotic use in veterinary practice: importance of wastewater microbiology. *In*: : Elsevier, 2020. p. 279-325.

ZHENG, N.; WANG, J.; HAN, R.; XU, X. *et al.* Occurrence of several main antibiotic residues in raw milk in 10 provinces of China. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, 6, n. 2, p. 84-89, 2013.

ZHOU, S. y. d.; ZHU, D.; GILES, M.; DANIELL, T. *et al.* Does reduced usage of antibiotics in livestock production mitigate the spread of antibiotic resistance in soil, earthworm guts, and the phyllosphere? **Environment International**, 136, p. 105359-105359, 2020.

ZHU, Y. G.; JOHNSON, T. A.; SU, J. Q.; QIAO, M. *et al.* Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110, n. 9, p. 3435-3440, 2013.

APÊNDICE 1 – ESTRATÉGIA DE BUSCA APLICADA NAS BASES DE DADOS

Pubmed

#1 Anti-Bacterial Agents[MeSH Terms] OR “anti-bacterial agents”[Title/Abstract] OR “anti bacterial agents”[Title/Abstract] OR "antibacterial agent*" [Title/Abstract] OR “anti-bacterial compounds”[Title/Abstract] OR “anti bacterial compounds”[Title/Abstract] OR "antibacterial compound*" [Title/Abstract] OR “anti-bacterial agent”[Title/Abstract] OR “anti bacterial agent”[Title/Abstract] OR “anti-bacterial compound”[Title/Abstract] OR “anti bacterial compound”[Title/Abstract] OR "bacteriocidal agent*" [Title/Abstract] OR "bacteriocide*" [Title/Abstract] OR "antibiotic*" [Title/Abstract] OR “anti-mycobacterial agents”[Title/Abstract] OR “anti mycobacterial agents”[Title/Abstract] OR “antimycobacterial agent*” [Title/Abstract] OR “anti-mycobacterial agent”[Title/Abstract] OR “anti mycobacterial agent”[Title/Abstract]

#2 Chemistry Techniques, Analytical[MeSH Terms] OR "analytical method*" [Title/Abstract] OR “analytical chemistry technique”[Title/Abstract] OR “analytical chemistry techniques”[Title/Abstract] OR “analytical chemistry methods”[Title/Abstract] OR “analytical chemistry method”[Title/Abstract] OR "detection"[Title/Abstract] OR “quantification”[Title/Abstract]

#3 Milk[MeSH Terms] OR “dairy”[Title/Abstract] OR “buttermilk”[Title/Abstract] OR “cheese”[Title/Abstract] OR “yogurt”[Title/Abstract] OR “whey”[Title/Abstract] OR “milk kefir”[Title/Abstract] OR “sour cream”[Title/Abstract]

#1 AND #2 AND #3

Total de artigos em 14/04/2021: 1.397

Scopus

#1 TITLE-ABS-KEY (“anti-bacterial agents”) OR TITLE-ABS-KEY (“anti bacterial agents”) OR TITLE-ABS-KEY ("antibacterial agent*") OR TITLE-ABS-KEY (“anti-bacterial compounds”) OR TITLE-ABS-KEY (“anti bacterial compounds”) OR TITLE-

ABS-KEY ("antibacterial compound*") OR TITLE-ABS-KEY ("anti-bacterial agent") OR TITLE-ABS-KEY ("anti bacterial agent") OR TITLE-ABS-KEY ("anti-bacterial compound") OR TITLE-ABS-KEY ("anti bacterial compound") OR TITLE-ABS-KEY ("bacteriocidal agent*") OR TITLE-ABS-KEY (bacteriocide*) OR TITLE-ABS-KEY (antibiotic*) OR TITLE-ABS-KEY ("anti-mycobacterial agents") OR TITLE-ABS-KEY ("anti mycobacterial agents") OR TITLE-ABS-KEY ("antimycobacterial agent*") OR TITLE-ABS-KEY ("anti-mycobacterial agent") OR TITLE-ABS-KEY ("anti mycobacterial agent")

#2 TITLE-ABS-KEY ("analytical method*") OR TITLE-ABS-KEY ("analytical chemistry technique") OR TITLE-ABS-KEY ("analytical chemistry techniques") OR TITLE-ABS-KEY ("analytical chemistry methods") OR TITLE-ABS-KEY ("analytical chemistry method") OR TITLE-ABS-KEY (detection) OR TITLE-ABS-KEY (quantification)

#3 TITLE-ABS-KEY (Milk) OR TITLE-ABS-KEY (dairy) OR TITLE-ABS-KEY (buttermilk) OR TITLE-ABS-KEY (cheese) OR TITLE-ABS-KEY (yogurt) OR TITLE-ABS-KEY (whey) OR TITLE-ABS-KEY ("milk kefir") OR TITLE-ABS-KEY ("sour cream")

#4 index(medline)

#1 AND #2 AND #3 AND NOT #4

Total de artigos em 14/04/2021: 991

Web of science

#1 TS=("anti-bacterial agents" OR "anti bacterial agents" OR "antibacterial agent*" OR "anti-bacterial compounds" OR "anti bacterial compounds" OR "antibacterial compound*" OR "anti-bacterial agent" OR "anti bacterial agent" OR "anti-bacterial compound" OR "anti bacterial compound" OR "bacteriocidal agent*" OR bacteriocide* OR antibiotic* OR "anti-mycobacterial agents" OR "anti mycobacterial agents" OR

“antimycobacterial agent*” OR “anti-mycobacterial agent” OR “anti mycobacterial agent”)

#2 TS= (“analytical method*” OR “analytical chemistry technique” OR “analytical chemistry techniques” OR “analytical chemistry methods” OR “analytical chemistry method” OR detection OR quantification)

#3 TS= (milk OR dairy OR buttermilk OR cheese OR yogurt OR whey OR “milk kefir” OR “sour cream”)

#1 AND #2 AND #3

Total de artigos em 14/04/2021: 2.786

APÊNDICE 2 – ESTUDOS INCLUÍDOS PARA A REVISÃO SISTEMÁTICA

AMIRIPOUR, F.; GHASEMI, S.; AZIZI, S. N. Design of turn-on luminescent sensor based on nanostructured molecularly imprinted polymer-coated zirconium metal-organic framework for selective detection of chloramphenicol residues in milk and honey. **Food Chemistry**, 347, Jun 2021.

AQDA, T. G.; BEHKAMI, S.; RAOOFI, M.; BAGHERI, H. Graphene oxide-starch-based micro-solid phase extraction of antibiotic residues from milk samples. **Journal of Chromatography A**, 1591, p. 7-14, Apr 2019.

CHEN, M.; GAN, N.; ZHOU, Y.; LI, T. *et al.* An electrochemical aptasensor for multiplex antibiotics detection based on metal ions doped nanoscale MOFs as signal tracers and RecJ(f) exonuclease-assisted targets recycling amplification. **Talanta**, 161, p. 867-874, Dec 2016.

CHU, L. L.; DENG, J. J.; KANG, X. J. Packed-nanofiber solid phase extraction coupled with HPLC for the determination of chloramphenicol in milk. **Analytical Methods**, 9, n. 46, p. 6499-6506, Dec 2017.

D'ORAZIO, G.; ROCCHI, S.; FANALI, S. Nano-liquid chromatography coupled with mass spectrometry: Separation of sulfonamides employing non-porous core-shell particles. **Journal of Chromatography A**, 1255, p. 277-285, Sep 2012.

DI, S. Y.; YU, J.; CHEN, P.; ZHU, G. T. *et al.* Net-like mesoporous carbon nanocomposites for magnetic solid-phase extraction of sulfonamides prior to their quantitation by UPLC-HRMS. **Microchimica Acta**, 187, n. 2, Jan 2020.

ERSHADI, S.; JOUYBAN, A.; SHAYANFAR, A. Determination of Enrofloxacin in Milk Samples Using Silver Nanoparticle Enhanced Terbium-Sensitized Fluorescence Method. **Food Analytical Methods**, 10, n. 11, p. 3607-3614, Nov 2017.

HAO, L.; DUAN, N.; WU, S.; XU, B. *et al.* Chemiluminescent aptasensor for chloramphenicol based on N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol-functionalized flower-like gold nanostructures and magnetic nanoparticles. **Anal Bioanal Chem**, 407, n. 26, p. 7907-7915, Oct 2015.

HE, H. B.; DONG, C.; LI, B.; DONG, J. P. *et al.* Fabrication of enrofloxacin imprinted organic-inorganic hybrid mesoporous sorbent from nanomagnetic polyhedral oligomeric silsesquioxanes for the selective extraction of fluoroquinolones in milk samples. **Journal of Chromatography A**, 1361, p. 23-33, Sep 2014.

HU, G.; SHENG, W.; ZHANG, Y.; WU, X. *et al.* A novel and sensitive fluorescence immunoassay for the detection of fluoroquinolones in animal-derived foods using upconversion nanoparticles as labels. **Anal Bioanal Chem**, 407, n. 28, p. 8487-8496, Nov 2015.

HUANG, S. F.; GAN, N.; ZHANG, X. Y.; WU, Y. X. *et al.* Portable fluoride-selective electrode as signal transducer for sensitive and selective detection of trace antibiotics in complex samples. **Biosensors & Bioelectronics**, 128, p. 113-121, Mar 2019.

JIANG, N. G.; ZHAO, M.; LANG, S. H.; CAO, J. K. *et al.* High-Throughput and High-Efficient Micro-solid Phase Extraction Based on Sulfonated-Polyaniline/Polyacrylonitrile Nanofiber Mats for Determination of Fluoroquinolones in Animal-Origin Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, n. 24, p. 6892-6901, Jun 2019.

KAZEMI, E.; DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H.; ABBASI, A. *et al.* Iron oxide functionalized graphene oxide as an efficient sorbent for dispersive micro-solid phase extraction of sulfadiazine followed by spectrophotometric and mode-mismatched thermal lens spectrometric determination. **Talanta**, 147, p. 561-568, Jan 2016.

LI, J. M.; ZHOU, Y. Q.; SUN, Z. A.; CAI, T. P. *et al.* Restricted access media-imprinted nanomaterials based on a metal-organic framework for highly selective extraction of fluoroquinolones in milk and river water. **Journal of Chromatography A**, 1626, Aug 2020.

LIU, B. Q.; TANG, D. P.; ZHANG, B.; QUE, X. H. *et al.* Au(III)-promoted magnetic molecularly imprinted polymer nanospheres for electrochemical determination of streptomycin residues in food. **Biosensors & Bioelectronics**, 41, p. 551-556, Mar 2013.

LIU, B. Q.; ZHANG, B.; CHEN, G. N.; TANG, D. P. Biotin-avidin-conjugated metal sulfide nanoclusters for simultaneous electrochemical immunoassay of tetracycline and chloramphenicol. **Microchimica Acta**, 181, n. 1-2, p. 257-262, Jan 2014.

LIU, H. B.; GAN, N.; CHEN, Y. J.; LI, T. H. *et al.* Three dimensional M X N type aptamerfunctionalized solid-phase micro extraction fibers array for selectively sorptive extraction of multiple antibiotic residues in milk. **Rsc Advances**, 7, n. 12, p. 6800-6808, 2017.

LU, Y.; SHEN, Q.; DAI, Z.; ZHANG, H. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the ultra-fast determination of chloramphenicol in egg, honey, and milk by fused-core C18-based high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, 398, n. 4, p. 1819-1826, Oct 2010.

LUAN, Q.; GAN, N.; CAO, Y. T.; LI, T. H. Mimicking an Enzyme-Based Colorimetric Aptasensor for Antibiotic Residue Detection in Milk Combining Magnetic Loop-DNA

Probes and CHA-Assisted Target Recycling Amplification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65, n. 28, p. 5731-5740, Jul 2017.

LUAN, Q.; XI, Y.; GAN, N.; CAO, Y. *et al.* A facile colorimetric aptamer assay for small molecule detection in food based on a magnetic single-stranded DNA binding protein-linked composite probe. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 239, p. 979-987, 2017.

MISHRA, G. K.; SHARMA, A.; BHAND, S. Ultrasensitive detection of streptomycin using flow injection analysis-electrochemical quartz crystal nanobalance (FIA-EQCN) biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, 67, p. 532-539, May 2015.

MUHAMMAD, N.; RAHMAN, A.; ADNANYOUNIS, M.; SUBHANI, Q. *et al.* Porous SnO₂ nanoparticles based ion chromatographic determination of non-fluorescent antibiotic (chloramphenicol) in complex samples. **Scientific Reports**, 8, Aug 2018.

NASIR, A. N. M.; YAHAYA, N.; ZAIN, N. N. M.; LIM, V. *et al.* Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products. **Food Chemistry**, 276, p. 458-466, Mar 2019.

PENG, R.; ZHOU, Z.; WANG, Q.; YU, Q. *et al.* An investigation of template anchoring strategy for molecularly imprinting materials based on nanomagnetic polyhedral oligomeric silsesquioxanes composites. **J Chromatogr A**, 1597, p. 28-38, Jul 2019.

RUIZ-PALOMERO, C.; SORIANO, M. L.; VALCÁRCEL, M. β -Cyclodextrin decorated nanocellulose: a smart approach towards the selective fluorimetric determination of danofloxacin in milk samples. **Analyst**, 140, n. 10, p. 3431-3438, May 2015.

SADEGHI, S.; OLIEAEI, S. Nanostructured polyaniline based pipette tip solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the selective determination of trace levels of three sulfonamides in honey and milk samples with the aid of experimental design methodology. **Microchemical Journal**, 146, p. 974-985, May 2019.

SAHEBI, H.; KONOZ, E.; EZABADI, A. Synthesis of DABCO-based ionic liquid functionalized magnetic nanoparticles as a novel sorbent for the determination of cephalosporins in milk samples by dispersive solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **New Journal of Chemistry**, 43, n. 34, p. 13554-13570, Sep 2019.

SAHEBI, H.; KONOZ, E.; EZABADI, A.; NIAZI, A. *et al.* Simultaneous determination of five penicillins in milk using a new ionic liquid-modified magnetic nanoparticle based dispersive micro-solid phase extraction followed by ultra-performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 154, May 2020.

SERESHTI, H.; KARAMI, F.; NOURI, N.; FARAHANI, A. Electrochemically controlled solid phase microextraction based on a conductive polyaniline-graphene oxide nanocomposite for extraction of tetracyclines in milk and water. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 101, n. 6, p. 2304-2311, Apr 2021.

TAVASSOLI, A.; AZIZI, S. N.; SAMADI-MAYBODI, A. Determination of Erythromycin in Milk Samples by Nano Magnetite Hexadecylsilane by LC-Tandem Mass Spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, 7, n. 3, p. 403-414, Sum 2020.

WANG, Y. T.; LIU, L. P.; XIAO, C. X.; CHEN, L. *et al.* Rapid Determination of Trace Sulfonamides in Milk by Graphene Oxide-Based Magnetic Solid Phase Extraction Coupled with HPLC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, 9, n. 9, p. 2521-2530, Sep 2016.

WEI, D.; WU, S. C.; ZHU, Y. Magnetic solid phase extraction based on graphene oxide/nanoscale zero-valent iron for the determination of tetracyclines in water and milk by using HPLC-MS/MS. **Rsc Advances**, 7, n. 70, p. 44578-44586, 2017.

WEI, Y. H.; LI, X. Y.; GAO, J.; LIU, J. J. *et al.* Size-dependent modulation of CoOOH nanoflakes light scattering for rapid and selective detection of tetracycline in milk. **Journal of Analysis and Testing**, 2, n. 4, p. 332-341, Oct 2018.

XU, J. J.; AN, M. R.; YANG, R.; TAN, Z. J. *et al.* Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Honey and Milk by Miniaturized Solid Phase Extraction Using Chitosan-Modified Graphitized Multiwalled Carbon Nanotubes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64, n. 12, p. 2647-2654, Mar 2016.

XU, X.; JIANG, Z. Q.; LAI, X. J.; ZHANG, B. J. *et al.* Studies on the visual screening method for fluoroquinolones based on the chain reaction of gold nanoparticles and its application in milk samples. **Microchemical Journal**, 146, p. 600-605, May 2019.

YOLA, M. L.; UZUN, L.; OZALTIN, N.; DENIZLI, A. Development of molecular imprinted nanosensor for determination of tobramycin in pharmaceuticals and foods. **Talanta**, 120, p. 318-324, Mar 2014.

YU, H.; JIA, Y.; WU, R.; CHEN, X. *et al.* Determination of fluoroquinolones in food samples by magnetic solid-phase extraction based on a magnetic molecular sieve nanocomposite prior to high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, 411, n. 13, p. 2817-2826, May 2019.

ZHAO, Y. F.; WU, R.; YU, H.; LI, J. K. *et al.* Magnetic solid-phase extraction of sulfonamide antibiotics in water and animal-derived food samples using core-shell magnetite and molybdenum disulfide nanocomposite adsorbent. **Journal of Chromatography A**, 1610, Jan 2020.

APÊNDICE 3 – TABELAS PARA EXTRAÇÃO DE DADOS

Estudo	Técnica analítica	Analitos (antibióticos)	Classe (antibiótico)	Matriz	Aplicação nanotecnológica	Local do estudo

Estudo	Seletividade	LOD e LOQ (µg/kg)	Faixa de linearidade (µg/kg) (R ²)	Precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial) (%RSD)	Recuperação (%)	Efeito matriz	Robustez